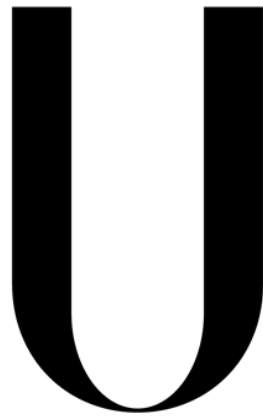


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

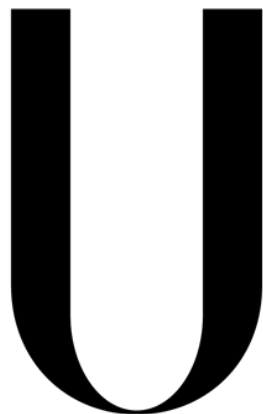
Uso de Células Estaminais em Medicina Dentária: Uma Revisão de Literatura

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Catarina Costa Marques

2014

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

Uso de Células Estaminais em Medicina Dentária: Uma Revisão de Literatura

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Catarina Costa Marques

2014

Dissertação, orientada pela Doutora Helena Francisco

“Como tudo é possível, ousemos fazer rumo ao impossível.”

- Professor Agostinho da Silva

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Doutora Helena Francisco pelo apoio, paciência e disponibilidade prestada no decorrer desta dissertação.

Aos meus pais, Maria Teresa Marques e Vasco Marques, que sempre acreditaram em mim mesmo quando eu própria duvidei, um muito obrigado. Pelo apoio imprescindível e amor incondicional, não há palavras que cheguem que demonstrem o que fizeram por mim.

Ao meu irmão Nuno Marques, que apesar de muitas dores de cabeça, dá-me muito mais alegrias.

Àquelas com que partilhei estes últimos anos de vida académica e pessoal, por tudo o que passámos de melhor e pior, um enorme obrigado. À Catarina Pinto, Madalena Levy, Marialice Fernandes, Inês Henriques e Soraia Andrade, porque sem vocês, não tinha sido a mesma coisa.

Um agradecimento especial à minha dupla, Catarina Pinto, que viveu os anos clínicos a meu lado, sem nunca vacilar e sempre com um sorriso na cara.

Ao Diogo Monteiro, meu amigo e namorado, que aguentou todos os choros e tristezas com paciência infindável, e a quem agradeço pelos momentos felizes que até hoje vivemos.

A todos os meus colegas, futuros Médicos Dentistas, com quem partilhei os últimos 5 anos da minha vida.

E por fim, aos Professores, Drs. e assistentes dentárias, por tudo o que aprendi com eles. Muito obrigada.

Glossário de Abreviaturas

PPR- Prótese Parcial Removível

AC – Antes de Cristo

PRP – Platelet Rich Plasma

BMP – Bone Morphogenetic Proteins

FGF – Fibroblast Growth Factor

Hh – Hedgehog

TNF - Tumor Necrosis Factor

WNT – WiNgless Transformig growth factor

TGF- β – Transforming Growth Factor beta

GDF - growth/differentiation factor

Shh – Sonic Hedgehog

iPS – induced Pluripotent Stem cells

DPSC – Dental Pulp Stem Cells

SHEDs - Stem cells from human exfoliated deciduous teeth

PDLSC – Periodontal Ligament Stem Cells

DFSCS – Dental Follicle Stem Cells

SCAP – Stem Cells of Apical Papilla

3D – 3 dimensões

EMD - enamel matrix derivative

PDGF - platelet-derived growth factor

HA – Hidroxiapatite

β -TCP – beta - Tricalcium phosphate

Índice

Resumo	V
<i>Abstract</i>	VI
1.Introdução	1
2. Materiais e Métodos	6
3. Matrizes (<i>Scaffolds</i>).....	7
4. Fatores de Crescimento	8
4.1 Proteínas ósseas morfogenéticas (BMP).....	8
4.2 Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)	9
4.3 Proteínas <i>Hedgehog</i> (Hh).....	9
4.4 Fator de necrose tumoral (TNF)	9
4.5 Fator de crescimento <i>Wingless</i> (WNT).....	9
5. Células estaminais (<i>Stem Cells</i>).....	10
5.1 Tipos de células estaminais.....	10
Células estaminais Dentárias Mesenquimatosas	12
Células estaminais Dentárias Epiteliais.....	16
Células estaminais pluripotenciais induzidas (iPS).....	18
6. Células Estaminais Mesenquimatosas e Epiteliais em Engenharia de Tecidos Dentários.....	19
7. Aplicações das Células estaminais e Engenharia de Tecidos em Medicina Dentária	20
7.1 Endodontia	21
7.2 Periodontologia.....	23
7.3 Cirurgia Maxilo-facial	26
7.4 Implantologia	28
7.5 Prostodontia	29

Conclusão	30
Referências Bibliográficas.....	31
Anexos.....	44

Resumo

O conhecimento associado ao uso de células estaminais (*stem cells*) no campo da Engenharia de Tecidos tem vindo a aumentar exponencialmente ao longo dos últimos anos. A capacidade de auto-renovação indefinida e indiferenciada da célula estaminal tem permitido caminhar no sentido da criação de um conceito de reabilitação oral associada à formação de órgãos biosintetizados, onde se inclui o dente e estruturas inerentes à cavidade oral.

A perda dentária é um fenómeno de crescente importância, tanto ao nível da saúde oral como geral, e que não cessará de ocorrer. Atualmente, os dentes podem ser substituídos recorrendo a diversas opções terapêuticas, como próteses ou implantes, mas que podem não alcançar a integridade funcional e estética concedida por uma dentição dita verdadeira. Assim, é importante para o médico dentista compreender de que forma a Engenharia de Tecidos e a utilização de células estaminais poderá evitar essa perda ou, em último caso, repor um dente perdido.

Também ao nível da regeneração tecidual aplicada aos tecidos de suporte do dente, como o ligamento periodontal ou osso alveolar, ou ainda no âmbito do controlo da morbilidade pós-cirúrgica, como na regeneração da língua e glândulas salivares, a engenharia de tecidos ganha real importância. As possibilidades trazidas por esta área inovadora à Medicina Dentária são inúmeras, e podem vir a trazer uma verdadeira melhoria da qualidade de vida e bem-estar dos pacientes. A aplicação da Engenharia de Tecidos e Células Estaminais à Medicina Dentária já não é uma utopia, mas uma realidade.

O objetivo desta revisão de literatura é abordar o estado atual da Bioengenharia de Tecidos e compreender de que forma esta área poderá ser aplicada aos campos clínicos da saúde oral.

Palavras-chave: Células Estaminais, Engenharia de tecidos, regeneração dentária, medicina dentária.

Abstract

In the field of Tissue Engineering, the knowledge associated with the use of stem cells has been exponentially growing for the last few years. The indefinite and undifferentiated self-renew capacity of the stem cell has enabled the creation of the concept of bioengineered organ-based oral rehabilitation, where not only a tooth can be included, but also oral cavity structures.

Loosing a tooth is a growing important phenomenon, both in oral and general health, and that will not cease to happen. Nowadays, teeth can be replaced by different therapeutical options, such as dentures or implants. However, these options may not reach the functional and aesthetic integrity granted by a so called real dentition. Therefore, it is important to the dentist to understand how Tissue Engineering and the use of stem cells might avoid that loss or replace a tooth through a bioengineered one.

Tissue Engineering gains real importance also at the level of tissue regeneration related with supportive tooth tissue, as the periodontal ligament or alveolar bone, or even in the post-surgical morbidity control, like in tongue and salivary glands regeneration. The possibilities brought by this innovative area to Dentistry are countless, and might bring a true improvement of the well-being and lifestyle of patients. Stem cells' and Tissue Engineering's application in Dentistry is no longer an utopia, but a reality.

The aim of this literature review is to approach the current state and trends of Tissue Bioengineering and understand in what way this area might be applied do the clinical fields of oral health.

Key-words: Stem cells, tissue engineering, tooth regeneration, Dentistry

1.Introdução

A perda de vários dentes pode não significar um risco imediato para a função de toda a dentição, mas pode iniciar diversos problemas relacionados com a região orofacial e com o bem-estar psicológico do paciente (Hubáľková *et al.*, 2006). Assim, por razões estéticas, psicológicas e médicas, a reposição do dente perdido é importante. A perda dentária pode ocorrer devido a diversas razões como doença periodontal, lesões de cárie, fraturas ou ainda alterações genéticas (Bluteau *et al.*, 2008) estando uma grande variedade de soluções protéticas disponíveis para o dentista.

As opções para a substituição de um único dente incluem prótese parcial removível, prótese parcial fixa (tradicional e adesiva/ponte de Maryland) e implantes dentários (Al-Quran *et al.*, 2011, Hebel *et al.*, 2000). Cada modalidade de tratamento é uma opção possível e tem as suas vantagens e desvantagens. Existem vários fatores que afetam a decisão final no plano de tratamento no que diz respeito à reposição do dente perdido. Em muitos casos, mais do que uma opção é possível, e o plano de tratamento final depende da decisão do paciente que pode ser influenciado pelo sexo, idade, estado financeiro e cultura geral. Assim, é importante reconhecer as necessidades do paciente para determinar o tipo de tratamento que assegura a satisfação com o serviço dentário (Al-Quran *et al.*, 2011).

1.1 Prótese Parcial Removível

Uma prótese parcial removível é uma opção de tratamento conservadora. Trata-se de um tratamento reversível que permite ao paciente seguir outros tratamentos alternativos no futuro, se desejado. É ideal em situações em que os potenciais dentes pilar ainda não estão totalmente erupcionados ou quando os processos alveolares ainda não estão totalmente desenvolvidos, como em pacientes jovens. Quando necessário, apenas uma preparação mínima do esmalte dentário é feita para uma PPR. De forma a existir uma melhor distribuição das forças oclusais e prevenir rotação, os apoios oclusais são colocados nos dentes pilar. Caso se antecipe a necessidade de adicionar dentes que serão perdidos após a realização da prótese, a realização de uma PPR poderá ser um tratamento de escolha. Também, em situações em que ocorreu uma redução significativa da altura do osso alveolar, um rebordo em acrílico rosa pode ser adicionado

ao pântico. Nestas circunstâncias, a PPR pode oferecer uma vantagem quando comparada com pontes fixas, onde poderá ser necessário um aumento cirúrgico do osso alveolar de forma a obter um rebordo alveolar mais adequado (Chan *et al.*, 1994).

No entanto, na maioria dos pacientes, é necessário uma maior estabilização através do aumento da área de cobertura da prótese. Se a PPR cobrir a porção anterior do palato, problemas fonéticos podem ocorrer. A acumulação de placa entre a PPR e o dente de suporte pode levar a lesões de cárie e problemas periodontais. Muitas vezes poderá ocorrer um compromisso estético, pois os ganchos metálicos são muitas vezes visíveis caso o paciente tenha uma linha de sorriso alta (Tjan *et al.*, 1981; Chan *et al.*, 1994). Os tratamentos que recorrem a prótese parcial removível acarretam muitas vezes risco de complicações como estomatite protética, hiperplasia gengival, úlceras traumáticas, disgeusia e síndrome da boca ardente (Holm-Pedersen *et al.*, 2008).

1.2 Prótese parcial fixa

Uma prótese fixa é suportada por dentes pilar e pode restaurar um espaço edêntulo único ou múltiplo, através da utilização de pânticos (Chan *et al.*, 1994).

Para o paciente, este tipo de reabilitação tem vantagem sobre a PPR pois, sendo uma prótese fixa, pode ser modelada para se assemelhar à forma do dente natural. Os resultados estéticos podem normalmente ser alcançados através de coroas metalocerâmicas ou zircónio-cerâmicas, nomeadamente em situações em que os dentes pilar já estão esteticamente comprometidos, em casos de pequenos apinhamentos, grandes restaurações, discrepâncias de tamanho e descoloração (Chan *et al.*, 1994).

O tratamento tradicional para um espaço edêntulo único era a prótese parcial fixa, cimentada a dentes pilar. A maior desvantagem desta técnica é a redução significativa dos dentes adjacentes, levando a um potencial aumentado de trauma pulpar (Chan *et al.*, 1994). Muitas vezes, em situações estéticas, é necessário talhar o dente com uma margem subgengival, o que, caso haja um mau ajuste da margem ou invasão do espaço livre biológico, pode resultar em inflamação e recessão gengival, com consequente compromisso estético (Chan *et al.*, 1994; Barber *et al.*, 2008).

1.3 Prótese fixa adesiva

As pontes adesivas ou de Maryland são uma alternativa à prótese fixa convencional. Estas são constituídas por um pôntico que é cimentado a um ou mais dentes de suporte. Uma ponte fixa adesiva feita pelo método direto é realizada em compósito, podendo ser reforçada ou não por uma estrutura em metal flexível ou em fibra. Se realizada pelo método indireto, uma subestrutura de metal, de compósito reforçado por fibra ou de cerâmica é fabricada no laboratório (Hebel *et al.*, 2000).

Esta opção oferece um método mais conservador para o dente. As preparações dentárias para além de mínimas, são limitadas às superfícies linguais dos dentes adjacentes. No entanto, estas preparações requerem uma técnica mais sensível pois devem limitar-se ao esmalte e ainda assim permitir espaço para a restauração sem causar interferências oclusais. A maior desvantagem desta solução é a frequência de descimentação (Hebel *et al.*, 2000), com taxas de descolamento de 25-31% (Hussey *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1989). No entanto, desde a introdução da ponte “Rochette” em 1970, esta técnica sofreu numerosos desenvolvimentos que permitem que, hoje em dia, seja uma técnica comumente utilizada para substituição de um dente perdido (Barber *et al.*, 2008).

1.4 Implantes dentários

Um implante dentário pode servir de suporte a uma coroa e, nesse caso, substituir um dente. Os esforços feitos no campo dos biomateriais levaram ao desenvolvimento de materiais biocompatíveis como o titânio, que pode ser inserido no osso maxilar ou mandibular para substituir dentes perdidos. Os implantes oferecem vantagens significativas em relação a pontes adesivas ou convencionais. Estes evitam a preparação desnecessária de dentes hígidos adjacentes à área edêntula como é necessário para uma prótese parcial fixa. Em situações em que os dentes adjacentes não têm quaisquer restaurações, o implante permite preservar a integridade destes dentes (Hebel *et al.*, 2000). No entanto, os implantes não são ainda completamente satisfatórios e o seu sucesso depende em grande parte da osteointegração (Bluteau *et al.*, 2008). A osteointegração representa uma ligação direta entre o implante e o tecido ósseo. No entanto, esta ligação carece de periodonto e cimento. Estes tecidos estão presentes normalmente em dentes naturalmente formados, e que funcionam como amortecedor do *stress* mecânico da mastigação (Lin *et al.*, 2009). A qualidade e quantidade de osso,

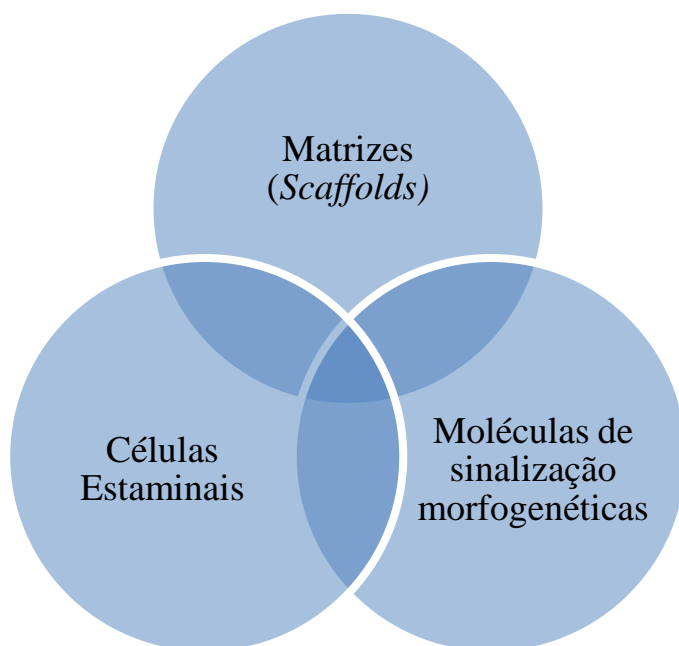
assim como a sua interação com a superfície do implante são alguns dos parâmetros cruciais que podem influenciar o sucesso da operação. Embora materiais e técnicas inovadoras tenham sido melhoradas para garantir uma melhor osteointegração (revisado por Le Guehennec *et al.*, 2007), a interface osso/metal não mimetiza completamente o dente natural. Também, a colocação do implante dentário depende do volume ósseo, pois os dispositivos podem ser apenas implantados em pacientes que possuam uma quantidade suficiente de osso. Frequentemente há necessidade de um aumento do volume de osso alveolar antes da cirurgia de colocação do implante (Bluteau *et al.*, 2008).

1.5 Engenharia de Tecidos

O reconhecimento de que partes do corpo podem regenerar data de 330 AC, quando Aristóteles observou que a cauda de um lagarto podia crescer de novo após o corte da sua ponta (Chandki *et al.*, 2012). Desde então o conhecimento na área da engenharia de tecidos cresceu exponencialmente, com grande foco na última década (Lympéri *et al.*, 2013).

A engenharia de tecidos é uma área interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e ciências da vida de encontro ao desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem, mantenham e melhorem a função tecidual (Langer *et al.*, 1993). Atualmente, os cientistas focam-se na engenharia dos tecidos dentários como um potencial tratamento, para além dos métodos protéticos existentes (Lympéri *et al.*, 2013).

É assim uma abordagem terapêutica promissora que visa substituir o dente perdido por um sintético ou restaurar tecido dentário danificado. A ferramenta principal são as células estaminais que são semeadas na superfície de determinados biomateriais que atuam como matrizes (*scaffolds*), de forma a criar um biocomplexo (Lympéri *et al.*, 2013). Este biocomplexo, em conjunto com moléculas de sinalização morfogénicas e os avanços recentes na área da medicina, transformaram as terapias baseadas em engenharia de tecidos numa realidade (Chandki *et al.*, 2012).



Esquema 1 - Tríade da Engenharia Genética

Dentro de pouco tempo, terapias com células estaminais vão ser capazes de corrigir fendas palatinas permitindo evitar várias cirurgias, corrigir defeitos ósseos e dentes cariados, problemas periodontais e, promissoriamente, regenerar um dente completo (Chandki *et al.*, 2012).

2. Materiais e Métodos

No âmbito desta revisão de literatura da literatura, foi efetuada uma pesquisa bibliográfica de artigos científicos com recurso à base de dados MEDLINE, Pubmed e Scielo. Os artigos foram obtidos através das revistas onde foram publicados, tendo como critérios de busca as palavras-chave utilizando conectores booleanos: *Stem cells*, *tissue engineering*, *scaffolds*, *tooth regeneration*, Engenharia de tecidos. Não foram definidos limites temporais da pesquisa. A pesquisa foi relacionada em língua inglesa e língua portuguesa. Nesta revisão de literatura foram incluídos revisões sistemáticas, estudos retrospectivos, estudos prospetivos clínicos, ensaios clínicos randomizados, estudos *in vitro*, estudos em animais e relatórios clínicos. Foram também utilizados livros com interesse para o tema.

3. Matrizes (*Scaffolds*)

Os tecidos estão organizados de forma tridimensional e uma estrutura de suporte ou matriz ou *scaffold*, apropriada é necessária para providenciar uma posição espacial correta das células, regular a sua diferenciação, proliferação ou metabolismo. Um *scaffold* apropriado pode permitir a ligação seletiva e localização celular, conter fatores de crescimento e biodegradar-se ao longo do tempo (Chandki *et al.*, 2012). Segundo Chandki *et al.*, em 2012, os requisitos de um *scaffold* são:

- Eficaz no transporte de nutrientes, oxigénio e resíduos;
- Biocompatível e atóxico;
- Forte física e mecanicamente;
- Poroso, de forma a permitir a colocação, distribuição e proliferação celular;
- Permeabilidade do meio de cultura;
- Capacidade de vascularização *in vivo*;
- Capacidade de manter o fenótipo celular osteoblástico,
- Fácil de fabricar;
- Gradualmente degradável e substituído por tecido de regeneração, mantendo as características teciduais da estrutura final.

As matrizes podem-se classificar como naturais ou sintéticas. As matrizes naturais são mais biocompatíveis mas os sintéticos permitem um melhor controlo das características psicoquímicas do meio, sendo melhores condutores no crescimento de novo tecido e quase não sofrendo contração. Algumas das matrizes mais comumente utilizadas estão sumariadas na tabela 1 :

<i>Scaffolds</i> Naturais/Biocompatíveis	<i>Scaffolds</i> sintéticos/Artificiais
Colagénio	Ácido poliláctico
Glicosaminoglicanos	Ácido poliglicólico
Matriz de dentina desmineralizada	Glicol polietileno
Fibrina	Arginina
PRP	Ácido poliláctico glicólico

Emdogain	Agarose
	Quitosana
	Hidroxiapatite
	Fosfato tricálcico
	Poliepsilon
	Caprolactona
	Biocerâmicas
	Titânio
	Hidrogel

Tabela 1 - Exemplos de Matrizes Naturais e Sintéticas (adaptado de Chandki *et al.*, 2012)

4. Fatores de Crescimento

As diferenças morfológicas entre dentes individuais numa dentição decorrem principalmente de diferenças na expressão espaço-temporal de vários genes odontogênicos. Estes genes codificam fatores de transcrição que regulam a síntese de várias proteínas sinalizadoras (fatores de crescimento), que vão mediar interações indutivas entre ectoderme e o mesênquima, afetando a multiplicação celular, a morte celular e citodiferenciação (Koussoulakou *et al.*, 2009; Hernandez *et al.*, 2013). Associam-se, principalmente, cinco famílias protéicas: BMP (Proteínas Ósseas Morfogenéticas), FGF (Fator de Crescimento de Fibroblastos), proteínas Hh (*Hedgehog*), TNF (Fator de Necrose Tumoral) e WNT (Fator de Crescimento *Wingless*) (Soares *et al.*, 2007).

4.1 Proteínas ósseas morfogenéticas (BMP)

A família BMP faz parte da super-família TGF- β . As BMPs podem ser divididas em 4 sub-famílias distintas: a primeira BMP-2 e 4; a segunda BMP-3 e BMP-3B, esta última também conhecida como fator de crescimento/diferenciação 10 (GDF-10, sigla do inglês *growth/differentiation factor*); a terceira BMPs 5, 6, 7 e 8 e a quarta GDFs 5, 6 e 7, também conhecidas por proteínas morfogenéticas 1, 2 e 3 derivadas da cartilagem (Soares *et al.*, 2007). Estas proteínas morfogenéticas ósseas são proteínas multifuncionais com um largo espectro de atividades biológicas, atuando em variados tipos celulares, regulando o crescimento, diferenciação, quimiotaxia, e apoptose celular (Hernandez *et al.*, 2013).

4.2 Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)

Vários membros da família FGF são expressos no gérmen do dente em desenvolvimento. Os membros da família FGF atuam em diferentes momentos da odontogênese, desde o início do desenvolvimento dentário até à formação da última cúspide (Zhang *et al.*, 2005). FGFs regulam a expressão de diversos genes e induzem a proliferação do mesênquima (Soares *et al.*, 2007).

4.3 Proteínas *Hedgehog* (Hh)

Na família das proteínas Hedgehog, Shh (sigla do inglês *Sonic Hedgehog*) é o único que é expresso nos dentes, nomeadamente durante o desenvolvimento inicial do gérmen dentário. Esta proteína possui duas funções no início da odontogênese: a formação do botão dentário, ao estimular a proliferação epitelial, e o aumento da sobrevivência da célula epitelial na fase de capuz (Cobourne *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2007).

4.4 Fator de necrose tumoral (TNF)

A estrutura mais proeminente na morfogênese do dente é o nó de esmalte, o centro de sinalização que se julga guiar a morfogênese dentária e determinar a morfologia final do dente (Jernvall *et al.*, 2000). Esta hipótese foi fortemente suportada pela evidência a partir de estudos direcionados para a via de sinalização dos fatores de necrose tumoral no desenvolvimento dentário, levando à crença de que estes são cruciais na formação das cúspides dos molares (Zhang *et al.*, 2005).

4.5 Fator de crescimento *Wingless* (WNT)

A família do gene WNT representa um grande e diversificado grupo de moléculas de sinalização envolvidas na modelação, proliferação e diferenciação de vários órgãos e tipos celulares. Inúmeros genes WNT são expressos nos dentes em desenvolvimento, estando maioritariamente restritos apenas ao epitélio dentário. A literatura sugere que o Wnt7b interaja na sinalização Shh para estabelecimento dos

limites entre a ectoderme oral e dentária, posicionando assim os locais de formação das estruturas dentárias. No entanto, a função detalhada de cada membro WNT no desenvolvimento dentário ainda não é clara (Zhang *et al.*, 2005).

5. Células estaminais (*Stem Cells*)

As células estaminais são células indiferenciadas, com a capacidade de se dividir e multiplicar por um período de tempo dando origem a células idênticas indiferenciadas. Também, sobre condições específicas, têm a capacidade de se diferenciarem em variados tipos de células que compõem o corpo humano (Ulmer *et al.*, 2010; Lymperi *et al.*, 2013; Rai *et al.*, 2013).

5.1 Tipos de células estaminais

5.1.1 Classificação segundo a fonte, em (Chandki *et al.*, 2012):

- Autólogas: obtidas do mesmo indivíduo para onde serão implantadas;
- Alogénicas: obtidas de um dador da mesma espécie;
- Xenogénicas: obtidas de um dador de outra espécie;
- Isogénicas/Singénicas: obtidas de um organismo geneticamente idêntico; gémeos, clones ou animais de investigação consaguíneos.

5.1.2 Classificação segundo a potencialidade (capacidade de diferenciação) (Chandki *et al.*, 2012):

- Totipotentes: podem-se diferenciar em todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários;
- Pluripotentes: Podem-se diferenciar em todos os tipos celulares exceto células da membrana embrionária;
- Multipotentes: Podem-se diferenciar em mais do que uma célula especializada;
- Unipotentes: Apenas se podem diferenciar num tipo de células.

5.1.3 Classificação segundo a origem:

- Embrionárias
- Adultas/somáticas/pós-natais/mesenquimais/mesenquimatosas
- Células pluripotenciais induzidas (iPS).

Assim, células estaminais embrionárias são pluripotentes, ou seja, podem diferenciar-se em quaisquer tipos de células somáticas e *in vitro*, dividir-se um número ilimitado de vezes (Thomson *et al.*, 1998; ; Ulmer *et al.*, 2010; Chandki *et al.*, 2012). São células derivadas da massa interna do blastocisto. O blastocisto é uma estrutura oca, composta por uma camada externa de células da qual resulta a placenta e outros tecidos de suporte necessários ao desenvolvimento fetal no útero, e uma massa interna – massa celular interna - que contém um agrupamento de células que vai dar origem aos três folhetos embrionários, ou seja, ectoderme, endoderme e mesoderme, a partir dos quais o embrião se desenvolve (Thomson *et al.*, 1998; Nedel *et al.*, 2009; Rai *et al.*, 2013). (*Ver Anexo – Ilustração 1*)

As células estaminais adultas são multipotentes, pois o seu potencial é normalmente limitado a uma ou mais linhagens de células especializadas (Rai *et al.*, 2013). Teoricamente, células estaminais adultas estão presentes em qualquer tipo de tecido (Ulmer *et al.*, 2010). Segundo D'Aquino *et al.*, 2008, de forma a minimizar a lesão infligida aquando da recolha da amostra de tecido e a limitar o enfraquecimento do órgão ou organismo, a concentração de células estaminais na amostra de tecido obtida deverá ser a mais alta possível. Dessa forma, embora presentes numa variedade de tecidos, os órgãos que são especialmente adequados para a recolha de células estaminais adultas incluem:

1. Células mesenquimatosas derivadas da medula óssea: Transplantes de medula óssea foram a primeira terapia de células estaminais a ser realizada com sucesso (Pompilio *et al.*, 2004). Atualmente, a recolha de células estaminais mesenquimatosas é feita através do sangue periférico em vez da aspiração direta de medula óssea (Rai *et al.*, 2013).
2. Células mesenquimatosas derivadas do tecido adiposo: normalmente recolhidas através de lipoaspiração (Choudhery *et al.*, 2013; Rai *et al.*, 2013).

3. Células mesenquimatosas derivadas do cordão umbilical: recolhidas do sangue do cordão umbilical (Laughlin *et al.*, 2001; Gang *et al.*, 2004).

4. Células mesenquimatosas derivadas do fluído amniótico: Isoladas do aspirado da amniocentese durante o rastreio genético ou recolha no momento do parto (De Gemmis P *et al.*, 2004).

5. Células estaminais dentárias: são as células estaminais mais acessíveis (Rai *et al.*, 2013). O dente e tecidos de suporte contêm linhagens múltiplas de células estaminais adultas (*Ver Anexo – Ilustração 2*), incluindo:

- Células estaminais mesenquimatosas da polpa dentária de dentes permanentes (DPSC)
- Células estaminais mesenquimatosas de dentes decíduos exfoliados (SHED)
- Células estaminais mesenquimatosas do ligamento periodontal (PDLSC)
- Células estaminais mesenquimatosas do folículo dentário (DFSCS)
- Células estaminais mesenquimatosas da papila dentária (SCAP)
- Células estaminais epiteliais de dentes em desenvolvimento
- Células estaminais epiteliais da alça cervical vestibular de dentes incisivos de roedores

As células epiteliais, de onde derivam os ameloblastos, vão formar esmalte e as células mesenquimatosas, que dão origem aos odontoblastos, são responsáveis pela formação de dentina e de todos os outros tecidos envolvidos no desenvolvimento e manutenção dentária, como polpa, vasos sanguíneos, cimento, ligamento periodontal e osso alveolar (Bluteau *et al.*, 2008). (*Ver Anexo – Ilustração 3*)

Células estaminais Dentárias Mesenquimatosas

- **Células estaminais mesenquimatosas da polpa dentária de dentes permanentes (DPSC)**

Em 2000, Gronthos *et al.* reportou pela primeira vez a presença de células estaminais na polpa dentária de adultos (Gronthos *et al.*, 2000). O mesmo grupo em 2002, demonstrou que as DPSCs podem proliferar dando origem a células idênticas e diferenciar-se em variados tipos de células com propriedades de células estaminais (Gronthos *et al.*, 2002). Para além disso, quando expostos a determinados sinais, podem induzir a diferenciação de células pulpareas progenitoras em odontoblastos, *in vivo*, levando à produção de dentina terciária. Entre estes sinais encontram-se hidróxido de cálcio ou fosfato de cálcio, que fazem parte de materiais utilizados pelo médico dentista em proteções pulpareas diretas ou indiretas após remoções de cárie próximas da polpa (Bluteau *et al.*, 2008; Lymperi *et al.*, 2013). A capacidade de estas células se diferenciarem em odontoblastos, osteoblastos, miócitos, adipócitos, neurónios e condrócitos, foi verificada *in vitro* (Gronthos *et al.*, 2002; Otaki *et al.*, 2007), podendo, *in vivo*, dar origem a tecidos mais complexos (Ulmer *et al.*, 2013; Kumabe *et al.*, 2006) e a complexos tecidulares do tipo dentina e polpa dentária (Gronthos *et al.*, 2000; El-Backly *et al.*, 2008). Em experiências animais *in vivo*, variadas diferenciações celulares foram encontradas, podendo estas células ser recolhidas de 3^{os} molares ou dentes pulpetomizados deixados *in situ*. Em adição, as DPSCs influenciam a angiogénese (D'Aquino *et al.*, 2007).

Todos estes estudos demonstraram que as DPSCs podem ser utilizadas em engenharia de tecidos dentários.

A regeneração dentária é um processo que ocorre durante toda a vida, o que sugere que células estaminais mesenquimatosas possam existir na polpa de dentes permanentes em adultos. No entanto, a terapêutica *in vivo* destas células estaminais adultas permanece por explorar (Bluteau *et al.*, 2008; Rai *et al.*, 2013). No futuro, estas células poderão ser usadas para tratar lesões de furca (Prescott *et al.*, 2008, Ulmer *et al.*, 2013).

- **Células estaminais mesenquimatosas de dentes decíduos exfoliados (SHED)**

Em 2003, Miura *et al.* provou a existência de células estaminais mesenquimatosas na polpa dentária de dentes decíduos, demonstrando que as SHEDs têm uma alta capacidade de proliferar e de se diferenciar *in vitro* em odontoblastos,

osteoblastos, adipócitos e células do tipo das células nervosas. Baseado em experiências de transplantação em camundongos, foi demonstrado que estas células têm a capacidade de se diferenciar em células produtoras de dentina, assim como de tecido ósseo. Em contraste com as células estaminais mesenquimatosas da polpa de dentes permanentes, estas não são capazes de formar um complexo pulpo-dentinário (Miura *et al.*, 2003). Cordeiro *et al.*, em 2008, sugeriu que as SHEDs também poderiam ser uma fonte de células estaminais ideal para reparação de dentes danificados ou para a indução de formação óssea. Este grupo de investigação demonstrou, em camundongos, que as SHEDs se diferenciavam em odontoblastos e que quando células endoteliais eram co-transplantadas, ocorria vascularização do enxerto (Cordeiro *et al.*, 2008). Isto indica que, no futuro, poderá ser explorada a utilização de células estaminais autólogas provenientes da polpa de dentes decíduos, previamente extraída e conservada, como terapêutica na reparação de dentina danificada e polpa. No entanto, a questão é se se poderá utilizar com sucesso células estaminais heterólogas para estas abordagens terapêuticas (Lymperi *et al.*, 2013).

• Células estaminais mesenquimatosas do ligamento periodontal (PDLSC)

O ligamento periodontal é encontrado entre o dente e o osso alveolar e consiste em fibras que mantêm o dente aderido ao osso alveolar. Pode ser isolado da raiz de 3^{os} molares impactados e contém células estaminais que se renovam e se diferenciam para formar outros tecidos, como cemento e osso alveolar (Seo *et al.*, 2004, 2005). No entanto, formam nódulos calcificados dispersos, quando em comparação com as PDLSCs (Mao *et al.*, 2008).

As PDLSCs podem-se diferenciar *in vitro* em adipócitos, osteoblastos e condrócitos (Gay *et al.*, 2007).

Num estudo com camundongos, estas células formaram estruturas semelhantes a osso, cemento, cartilagem e ligamento periodontal. Num estudo com suínos estas células foram utilizadas para curar lesões periodontais (Liu *et al.*, 2008). Noutro estudo, PDLSCs combinadas com células estaminais da papila dentária levaram à formação de uma raiz e complexo periodontal, capaz de suportar uma coroa cerâmica artificial, restaurando função normal do dente (Sonoyama *et al.*, 2006).

Um estudo mais recente, demonstrou que PDLSCs humanas diferenciadas em osteoblastos produziam altas concentrações de Ca^{2+} e óxido nítrico, importantes moléculas de sinalização no osso. Isto sugere que o transplante local de PDLSCs, em conjunto com óxido nítrico poderá ser um novo e promissor método para o tratamento de lesões periodontais (Orciani *et al.*, 2009). Ainda, PDLs previamente colocadas em cultura com células apicais germinativas, foram transplantadas para camundongos levando à produção de cemento e ligamento periodontal (Yang *et al.*, 2009).

- **Células estaminais mesenquimatosas do folículo dentário (DFSCs)**

O folículo dentário envolve o dente em desenvolvimento e desempenha um importante papel na formação do cemento, ligamento periodontal e osso alveolar. As DFSCs foram isoladas do folículo de 3^{os} molares e foi registado que podem permanecer em cultura durante algum tempo (Morszeck *et al.*, 2005). As DFSCs foram diferenciadas em osteoblastos, adipócitos e células tipo células nervosas, *in vitro*, (Kémoun *et al.*, 2007, Coura *et al.*, 2008, Yao *et al.*, 2008) enquanto, *in vivo*, estas foram capazes de se diferenciar em cementoblastos (Handa *et al.*, 2002).

Outro estudo revelou que o transplante de DFSCs em camundongos resultou na formação de um novo ligamento periodontal, 4 semanas pós-transplante (Yokoi *et al.*, 2007).

- **Células estaminais mesenquimatosas da papila dentária (SCAP)**

A papila apical é o tecido precursor da polpa dentária. Uma importante fonte de SCAPs são os 3^{os} molares e dentes com ápexes abertos (Lymperi *et al.*, 2013).

As SCAPs podem diferenciar-se, *in vitro*, em osteoblastos, odontoblastos e adipócitos e, *in vivo*, em osteoblastos e odontoblastos (Kikuchi *et al.*, 2004; Ikeda *et al.*, 2006). Estas células têm, quando comparadas com as DPSCs, uma maior taxa de diferenciação e são mais eficientes, no que diz respeito à formação dentária, tendo também um fácil acesso devido a poderem ser isoladas de 3^{os} molares (Bluteau *et al.*, 2008; Sonoyama *et al.*, 2006). O transplante de SCAPs e PDLSCs em conjunto com

HA/TGT (hidroxiapatite/ fosfato tricálcico) como veículo, em camundongos, resultou na formação de dentina e cimento/fibras de Sharpey, respetivamente. É assim sugerido que a combinação de células estaminais dentárias mesenquimatosas possam regenerar o complexo raíz/ligamento periodontal (Sonoyama *et al.*, 2006).

Assim, as SCAPs fazem parte de uma categoria de células que participa na terapia de regeneração endodôntica (revascularização) (Lymperi *et al.*, 2013).

Células estaminais Dentárias Epiteliais

Atualmente não existe informação sobre o uso de células estaminais epiteliais em humanos, pois os ameloblastos e os seus precursores são eliminados pouco depois da erupção dentária (Rai *et al.*, 2013; Bluteau *et al.*, 2008; Lymperi *et al.*, 2013). Estas são as únicas células de origem ectodérmica que participam na formação dentária (Ulmer *et al.*, 2010; Lymperi *et al.*, 2013). Assim, células epiteliais que poderiam ser estimuladas *in vivo* a produzir esmalte não estão presentes no dente humano erupcionado, levando a que a tecnologia de células estaminais apenas seja capaz, atualmente, de recrear uma superfície de esmalte (Rai *et al.*, 2013, Lymperi *et al.*, 2013). Isto levanta problemas éticos, pois a recolha de células estaminais epiteliais teria de ser realizada previamente à erupção dentária, envolvendo cirurgia numa idade jovem.

• Células estaminais epiteliais de molares em desenvolvimento

Foram realizados estudos em modelos animais, em que células estaminais epiteliais foram isoladas a partir de 3^{os} molares de animais jovens ou recém-nascidos. O epitélio foi inicialmente isolado e as células enzimaticamente separadas e amplificadas, *in vitro*. Foram então combinadas com células estaminais mesenquimatosas recolhidas do mesmo dente e expostas a biomateriais, tais como esponjas de colagénio ou polímeros sintéticos (Honda *et al.*, 2005, 2007a, 2007b).

Honda *et al.*, em 2005, comprovou a formação de ameloblastos, bainha epitelial dentária e tecido dentinário a partir de agregados de células epiteliais. Houve também formação de dentina coberta por esmalte e cimento, um processo provavelmente mediado pela interação epitélio-mesenquima. Estes resultados sugerem que o desenvolvimento de dentes biosintetizados se aproxima bastante do processo de odontogénese natural derivado de células epiteliais e mesenquimatosas imaturas (Honda

et al., 2005). Já em 2007, foi alcançada a formação de complexos compostos por dentina e esmalte, através da combinação de células epiteliais odontogénicas com células mesenquimatosas e implantação numa matriz de colagénio *in vivo*, demonstrando que esse sistema de cultura permite a diferenciação de células precursoras em ameloblastos com capacidade de produzir amelogenina e formar esmalte *in vivo* (Honda *et al.*, 2007a). No mesmo ano, com o objetivo de controlar a morfologia dentária, foi aplicada uma nova técnica de implantação celular no *scaffold*, *in vivo*, levando à formação de uma estrutura morfolologicamente semelhante a um dente. Isto sugere que a técnica de implantação celular no *scaffold* pode ter influência na regulação da morfologia do dente regenerado (Honda *et al.*, 2007b).

No entanto, estudos futuros são necessários para atingir a criação de dentes estruturalmente hígidos.

Estas abordagens são promissoras para a formação e/ou regeneração dentária. No entanto, a sua aplicação clínica é difícil, se não irrealista, pois inclui a doação de um gérmen dentário de uma criança. O uso de células estaminais autólogas é desejado mas levanta, ainda, questões éticas incontornáveis (Bluteau *et al.*, 2008; Lymperi *et al.*, 2013).

- **Células estaminais epiteliais da alça cervical vestibular de dentes incisivos de roedores**

O dente incisivo do roedor é um modelo único para o estudo de células estaminais epiteliais pois, ao contrário do que ocorre no incisivos humanos, este dente desenvolve-se continuamente ao longo da vida. Assim, o nicho de células estaminais epiteliais que está localizado na porção apical do epitélio do incisivo (área da alça cervical) é uma fonte permanente de matriz de esmalte (Ulmer *et al.*, 2010). (*Ver Anexo – Ilustração 4*)

Embora estas descobertas sejam importantes para a compreensão dos mecanismo de migração, renovação e diferenciação de células estaminais, esta fonte de células estaminais epiteliais não pode ser usada no tratamento de humanos pois necessitaria da introdução de células de roedores na boca humana. Estas células podem ser isoladas de dentes pós-natais mas exibem problemas complexos que limitam

fortemente a sua aplicação clínica em humanos. Outras fontes são então necessárias (Bluteau *et al.*, 2008).

Células estaminais pluripotenciais induzidas (iPS)

As células estaminais pluripotenciais induzidas (iPS) são pluripotentes e referem-se a células adultas ou somáticas que foram reprogramadas geneticamente para se comportarem como células estaminais embrionárias. Estas células expressam marcadores de células estaminais e são capazes de gerar células características dos três folhetos embrionários (Horst *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2006, 2007; Yamanaka *et al.*, 2007, Tanabe *et al.*, 2014). As primeiras iPS foram desenvolvidas a partir de células adultas de ratos por Yamanaka e Takahashi em 2006 (Yamanaka *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2006) e a partir de células adultas humanas, pelo mesmo grupo, em 2007 (Takahashi *et al.*, 2007). Um dos maiores obstáculos na aplicação clínica da regeneração dentária é a identificação de uma fonte apropriada de células estaminais autólogas (Otsu *et al.*, 2011; Arakaki *et al.*, 2012). Assim, esta descoberta inovadora providenciou uma fonte adequada de células estaminais, possível através da desdiferenciação de células que mantêm as características imunológicas específicas do dador necessárias para prevenir rejeição pelo sistema imunitário. Estas células podem ser produzidas a partir de tecidos normais e afetados. Esta abordagem é também útil para reprogramar células estaminais adultas para gerar células de diferentes origens (Horst *et al.*, 2012).

No entanto, a compreensão científica destas células e de como controlar a sua diferenciação ainda é limitada. Apesar das semelhanças entre as iPS e as células estaminais embrionárias, ainda não é claro se estas são exatamente iguais (Egusa *et al.*, 2012a). Estudos recentes indicam que nem todas as iPS são iguais entre si e que algumas retêm a memória epigenética do seu fenótipo passado, o que pode limitar o seu potencial de diferenciação (Kim *et al.*, 2010; Polo *et al.*, 2010).

6. Células Estaminais Mesenquimatosas e Epiteliais em Engenharia de Tecidos Dentários

Vários estudos foram feitos na tentativa de reconstrução de dentes *in vitro* e *in vivo* através da combinação de células estaminais epiteliais e mesenquimatosas (Amar *et al.*, 1989; Yoshida *et al.*, 1998).

Como anteriormente referido, células estaminais dentárias epiteliais e mesenquimatosas com origem em ratos, suínos e camundongos foram colocadas em cultura no laboratório e semeadas na superfície de diferentes biomateriais, antes do seu transplante para camundongos. (Ver Anexo – Ilustração 5) Todos os relatórios publicados indicaram a formação de dentina e esmalte, indiciando assim que estas células estaminais dentárias podem ser reorganizadas, levando à formação de folhetos separados e independentes e diferenciadas em odontoblastos e ameloblastos (Honda *et al.* 2006, 2007; Hu *et al.*, 2006). Estes dentes biosintetizados formaram-se em localizações ectópicas e apresentaram-se com falta de importantes elementos como uma raiz completa e tecidos periodontais que permitem a correta implantação no dente alveolar. No entanto, em 2007, Nakao *et al.* publicou um estudo sobre a formação de um dente na mandíbula de camundongos. As células dentárias epiteliais e mesenquimatosas foram semeadas numa gota de gel de colagénio e implantadas na cavidade oral de camundongos. Isto levou à formação de um dente estruturalmente correto com odontoblastos, ameloblastos, polpa dentária, tecido vascular, coroa, ligamento periodontal, raiz e osso alveolar. Concluiu-se assim que a implantação na mandíbula permitiu o desenvolvimento, maturação e emergência do dente (Nakao *et al.*, 2007). Estes resultados são uma forte indicação que as células estaminais dentárias podem ser usadas para a substituição de um dente perdido, num humano.

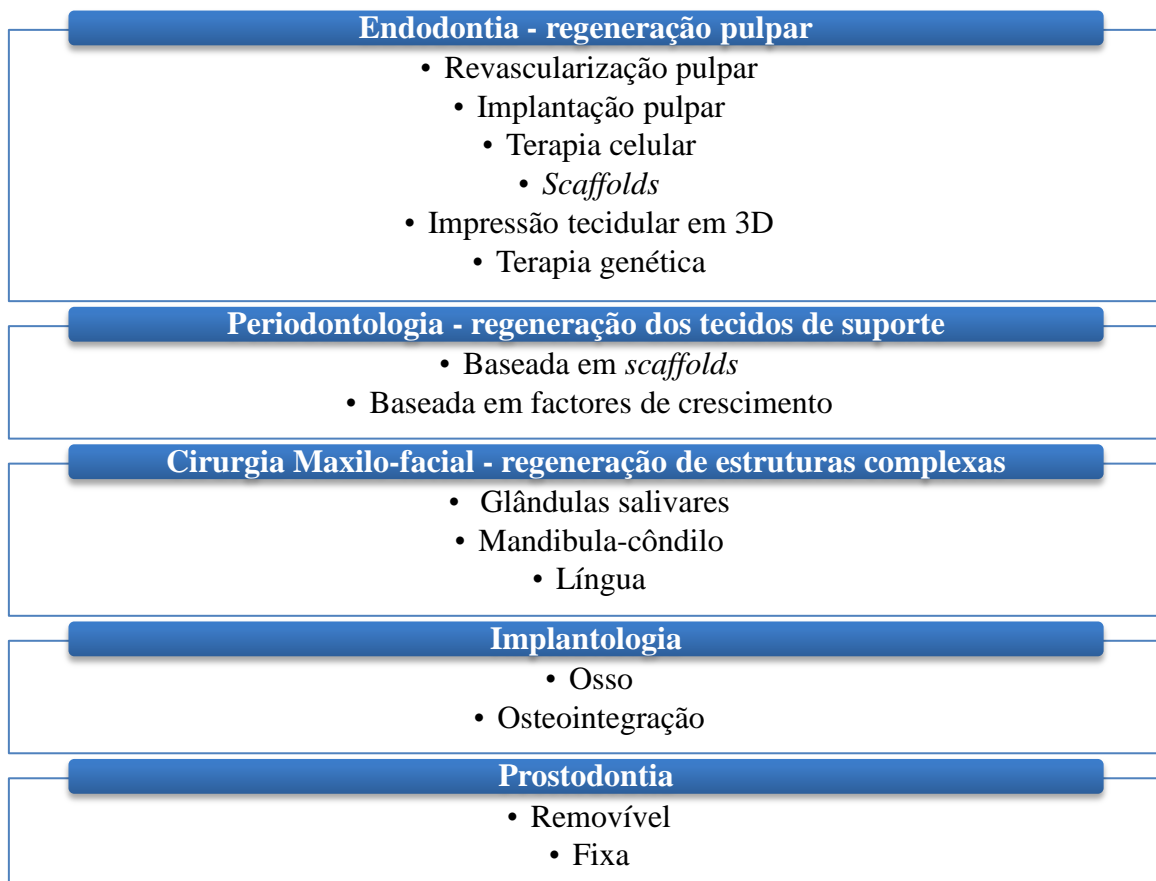
Outro estudo de 2009, demonstrou uma substituição bem sucedida e funcional de um dente em camundongos através do transplante de um gérmen dentário biosintetizado no osso alveolar, na área do dente em falta. Células estaminais epiteliais e mesenquimatosas derivadas de gérmenes de molares foram cultivadas e recombinadas com um biomaterial *in vitro*. O molar foi então extraído e o transplante do gérmen ocorreu três semanas depois, para permitir a recuperação física do epitélio da cavidade

oral. Finalmente, demonstrou-se que o dente biosintetizado que surgiu na cavidade oral tinha uma morfologia e capacidade funcional correta (Ikeda *et al.*, 2009).

Atualmente existem algumas limitações na regeneração dentária. Os princípios de engenharia de tecidos, relacionados com regeneração dentária, poderão não mimetizar a morfologia dentária; não existe um ambiente embrionário que permita que células da medula espinhal se diferenciem em células do gérmen dentário; poderá haver rejeição imune do hospedeiro; e também poderão existir questões éticas quanto ao uso de um embrião humano (Rai *et al.*, 2013).

7. Aplicações das Células Estaminais e Engenharia de Tecidos em Medicina Dentária

A divisão por disciplinas das aplicações das células estaminais em Medicina Dentária é puramente académica, fazendo as suas possíveis utilizações parte de uma visão multidisciplinar.



7.1 Endodontia

7.1.1 Revascularização do canal radicular através da formação de coágulo

Vários estudos documentaram revascularização (Reynolds *et al.*, 2009, Shin *et al.*, 2009) do sistema de canais pulpares através de desinfecção seguida de hemorragia causada por sobreinstrumentação (Iwaya *et al.*, 2001; Banchs *et al.*, 2004). A vantagem desta técnica prende-se na baixa probabilidade de infeção e rejeição imune devido ao facto de a regeneração tecidular ser feita através das células sanguíneas do próprio paciente. No entanto, algumas críticas devem ser feitas a esta técnica. É preciso ter em conta alguns cuidados, pois a fonte do tecido regenerado, assim como a concentração e composição das células presas no coágulo de fibrina são imprevisíveis (Murray *et al.*, 2007). Mais estudos são necessários para compreender o potencial desta técnica, antes de ser recomendado o seu uso generalizado em pacientes (Rai *et al.*, 2013).

7.1.2 Regeneração da polpa através de implantação pulpar

As células pulpares desenvolvem-se, em laboratório, em membranas biodegradáveis de forma a formarem camadas de tecido pulpar que são, mais tarde, implantadas no interior do canal radicular. Isto permite que sejam realizados testes de citotoxicidade aos materiais utilizados. No entanto, como estas camadas de tecido pulpar não têm vascularização, não existe aderência às paredes pulpares, e apenas a porção mais apical do sistema de canais vai receber e integrar este complexo. São então implantadas *matrizes* na porção coronal de forma a potenciar o desenvolvimento e proliferação celular (Murray *et al.*, 2007).

7.1.3 Terapia celular com células estaminais adultas

Células estaminais adultas, colhidas da pele, mucosa oral, tecido adiposo ou osso são injetadas no sistema canalar desinfetado após a abertura do ápex. A recolha e transferência destas células, através do uso de seringa é relativamente fácil, sendo bastante elevado o potencial destas células de induzir regeneração pulpar. No entanto, estas células têm uma taxa de sobrevivência bastante baixa e podem migrar para outras localizações no corpo (Brazelton *et al.*, 2005). Assim, tanto as matrizes como os fatores

de crescimento são indispensáveis de forma a maximizar o sucesso da regeneração pulpar (Nakashima, 2005; Murray *et al.*, 2007; Rai *et al.*, 2013).

7.1.4 Implantação de matrizes

A colocação de matrizes no sistema canalar para melhorar a taxa de proliferação e diferenciação de células estaminais é essencial. Um *scaffold* deve conter, para além de fatores de crescimento, BMPs, fatores de crescimento de fibroblastos e fatores de crescimento vasculares endoteliais, também nutrientes que promovam a sobrevivência celular e antibióticos de forma a prevenir crescimento bacteriano dentro do sistema canalar (Rai *et al.*, 2013).

Os hidrogéis injetáveis apresentam a facilidade de ser colocados com o uso de uma seringa (Trojani *et al.*, 2005), o que facilita a sua aplicação no sistema canalar e não são invasivos (Luo *et al.*, 2004). No entanto, ainda se encontram num estadio precoce de investigação (Rai *et al.*, 2013).

7.1.5 Impressão tecidular em 3D

Esta técnica pode ser usada para posicionar com precisão as células, de forma a que tenham o potencial de criar tecido bem estruturado que mimetiza a morfologia da polpa natural (Barron *et al.*, 2005). A orientação correta da estrutura do tecido pulpar colocado dentro de um canal limpo e com morfologia incomum, é essencial para o sucesso desta técnica. No entanto, a investigação atual direcionada ao uso desta técnica em endodontia ainda não demonstrou que se possa criar tecido funcional *in vivo* (Murray *et al.*, 2007; Rai *et al.*, 2013).

7.1.6 Terapia genética

A terapia genética aplicada à área da endodontia envolve a codificação de um gene que produz uma proteína terapêutica que é depois introduzida nas células. Estas células vão então expressar essa mesma proteína (Rutherford 2001; Gafni *et al.*, 2004; Mammen *et al.*, 2007). Embora sistemas virais tenham sido utilizados com sucesso numa ampla gama de tecidos, estes acarretam sérios riscos de saúde, como risco

mutagénico, carcinogénico e risco de desenvolvimento de ações imunes (Murray *et al.*, 2007). Huang *et al.*, em 2010, demonstrou em camundongos que tecido-tipo pulpar pode ser regenerado *de novo* dentro de um canal vazio através de células estaminais provenientes a papila apical, levando à produção de tecido semelhante a dentina (Huang *et al.*, 2010; Rai *et al.*, 2013).

O futuro desenvolvimento da endodontia regeneradora vai precisar de uma investigação abrangente, direcionada para cada componente e a sua aplicação clínica (Chandki *et al.*, 2012).

7.2 Periodontologia

O conceito base da terapia regenerativa convencional periodontal baseia-se na remoção da fonte de infeção providenciando, depois, um espaço onde as células vizinhas se possam desenvolver e multiplicar (Needleman *et al.*, 2006).

7.2.1 Regeneração tecidular convencional baseada em matrizes

Nos anos 80, vários tipos de biomateriais promotores de regeneração tecidular guiada foram desenvolvidos (Gottlow *et al.*, 1986; Nyman *et al.*, 1987), podendo ser derivados de colagénio (reabsorvíveis), polímeros (não reabsorvíveis) e de titânio. Alguns destes materiais são bioinertes pelo que não estimulam a formação óssea e não aderem diretamente ao osso. No entanto, quando as técnicas de preservação/aumento da quantidade óssea são necessárias, estas requerem o uso de materiais bioativos, como fosfato de cálcio e enxertos à base de colagénio. Neste procedimento, regeneração óssea e do tecido conjuntivo ocorrem no interior do defeito ósseo, que é protegido por estas barreiras que impedem a migração rápida de tecido epitelial (Egusa *et al.*, 2012b).

Independentemente do tipo de material, o desafio na regeneração guiada por matrizes é determinar as propriedades mais eficazes (por ex. porosidade, geometria de superfície e força mecânica) para suportar a atividade celular necessária para promover o crescimento ósseo pelas células hospedeiras. Ainda, as propriedades de um adequado veículo de transporte das matrizes devem ser determinadas, de forma a haver um controlo da libertação de fatores bioativos osteogénicos (Egusa *et al.*, 2012b).

7.1.2 Regeneração tecidual convencional baseada em fatores de crescimento

O desenvolvimento ósseo respeita uma cascata sequencial organizada por uma variedade de células e fatores de crescimento (Long 2011; Teti 2011). A regeneração tecidual pode ser parcialmente considerada com uma recapitulação parcial do normal desenvolvimento ósseo; assim, é racional a utilização de fatores de crescimento para recrutar células estaminais para defeitos tecidulares e estimular a sua regeneração (Egusa *et al.*, 2012b).

Uma terapia que utiliza fatores de crescimento para regeneração periodontal é a aplicação de plasma enriquecido com plaquetas (*Platelet-rich plasma* - PRP), que consiste em plaquetas autólogas concentradas num pequeno volume plasmático. O PRP contém diferentes fatores de crescimento e elementos de matriz (Intini, 2009) que têm a capacidade de regenerar defeitos periodontais. Atualmente, existe um grande interesse no uso de PRP em combinação com enxertos ósseos ou células estaminais autólogas com o objetivo de conseguir regeneração periodontal previsível (Egusa *et al.*, 2012b).

Os resultados inconclusivos dos estudos clínicos realizados podem, em parte, ser devidos às variações na contagem plaquetar e componentes dos fatores de crescimento entre as diferentes preparações (Intini, 2009). Todavia, neste momento, não existe nenhum estudo humano que suporte fortemente só a utilização de PRP para tratar perdas severas de osso alveolar, como por exemplo em elevações do seio maxilar (Egusa *et al.*, 2012b).

Outro produto, um derivativo da matriz de esmalte (*enamel matrix derivative* – EMD) tem sido também largamente utilizado em regeneração periodontal (Sculean *et al.*, 2007), sendo composto primariamente por amelogénina. Apesar dos seus resultados clínicos encorajadores, os mecanismos subjacentes aos efeitos deste material ainda não são completamente compreendidos (Egusa *et al.*, 2012b).

Recentemente, vários fatores de crescimento recombinantes têm sido apresentados na área da regeneração periodontal/óssea, assim como a proteína morfogénica óssea-2 (*bone morphogenic protein*- BMP-2); fator de crescimento plaquetário BB (*platelet-derived growth factor* BB- PDGF-BB); e fator de crescimento fibroblástico-2 (*fibroblast growth factor*- FGF-2) (Murakami 2000; Kitamura *et al.*, 2011).

Os resultados clínicos da terapia baseada em materiais (matrizes e fatores de crescimento) indicam que perdas parciais de tecidos periodontais/osso (defeitos infraósseos ou de furca) podem ser tratados utilizando materiais bioativos num ambiente que é adequado a cicatrização natural. Se a regeneração parcial de um tecido periodontal é desejada num paciente, uma terapia baseada em fatores de crescimento e/ou matrizes deve ser considerada como primeira escolha, pois terapias baseadas em células estaminais são caras e trabalhosas. No entanto, tem sido descrito variabilidade nos resultados clínicos das terapias baseadas em materiais, podendo levar a resultados inesperados (Ivanovski 2009; Sahrman *et al.*, 2011). É clinicamente evidente que um aumento ósseo de um rebordo alveolar severamente atrófico, particularmente em aumentos verticais ósseos durante regeneração óssea guiada ou elevações do seio maxilar, não podem ser facilmente conseguidas através do uso de terapias baseadas em matrizes ou fatores de crescimento, pois estes materiais convencionais não são osteoindutores. Assim, reabsorção induzida por osteoclastos ativados vai ocorrer contra o transplante. Mesmo que fatores de crescimento osteoindutores sejam aplicados às matrizes, o seu efeito pode ser insuficiente para levar as células hospedeiras a migrar para o local do defeito (Egusa *et al.*, 2012b).

Assim, osso autólogo tem sido utilizado convencionalmente para grandes defeitos ósseos pois possui capacidades osteogénicas, osteocondutoras e osteoindutoras. No entanto, enxertos ósseos autólogos exibem uma grande variabilidade no seu potencial osteogénico entre locais de recolha e indivíduos, o que pode levar a resultados indesejados. Também, a dificuldade de recolha, amostra oral limitada, e morbilidade associada ao local dador tem sido observada, encorajando assim o desenvolvimento de terapias baseadas em células estaminais como um método alternativo (Egusa *et al.*, 2012b).

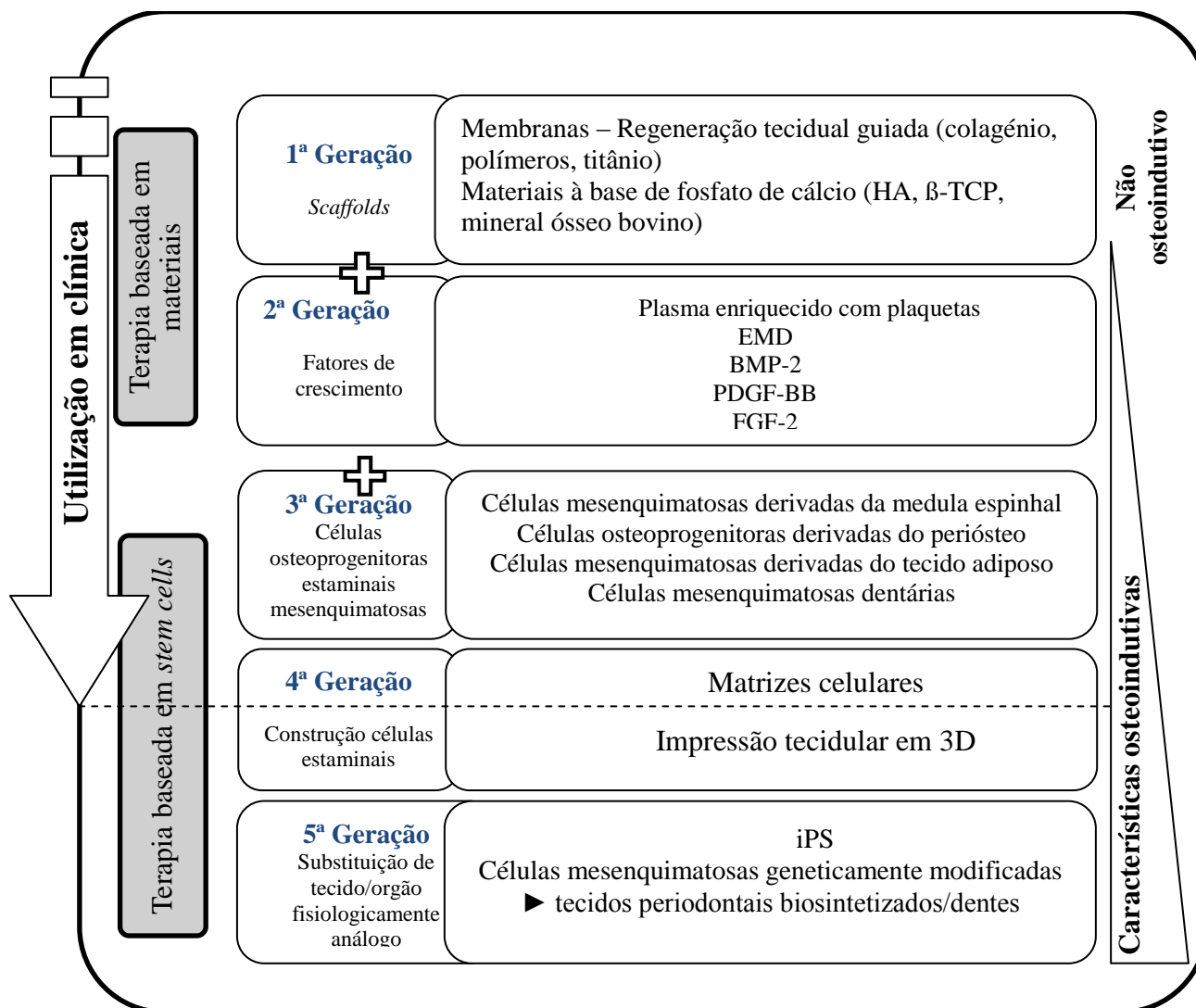


Figura 2 - adaptado de Egusa *et al.*, 2012b

7.3 Cirurgia Maxilo-facial

As tecnologias de regeneração de tecidos/orgãos complexos, tal como dentes, glândulas salivares, côndilo mandibular e língua, não alcançaram ainda a prática clínica devido à sua complexidade estrutural e de desenvolvimento. No entanto, recentes avanços baseados em pesquisa animal identificaram estratégias possíveis para regenerar estes tecidos/orgãos.

7.3.1 Regeneração de glândulas salivares

A regeneração de glândulas salivares através do transplantes de células estaminais é um importante tópico de estudo na oncologia de cabeça e pescoço e

cirurgia, pois a radioterapia muitas vezes associada prejudica inevitavelmente a função das glândulas salivares resultando em xerostomia como um efeito secundário (Egusa *et al.*, 2012b). Na literatura estão descritas duas abordagens principais para restaurar glândulas salivares danificadas: uma forma consiste em desenvolver tecido glandular artificial através de técnicas de engenharia de tecidos (Joraku *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2005; Miyajima *et al.*, 2011); a outra baseia-se na aplicação de células estaminais no tecido salivar danificado (Kojima *et al.*, 2011). Variados estudos demonstraram, em camundongos, a possibilidade de restaurar a função de glândulas salivares irradiadas (Lombaert *et al.*, 2008; Kojima *et al.*, 2011; Nanduri *et al.*, 2011; Sumita *et al.*, 2011).

7.3.2 Regeneração do côndilo mandibular

As lesões na articulação temporomandibular, ao nível do disco ou côndilo, devido a trauma ou artrite pode resultar em dor vitalícia e numa função mastigatória alterada. A regeneração tecidular nestes defeitos pode ser promissora, tendo em conta uma melhoria na qualidade de vida destes pacientes. Num modelo animal, a combinação de tecido cartilágneo biosintetizado a partir de células progenitoras com distração óssea foi realizado com sucesso para reconstruir defeitos condilares osteocondrais (Yu *et al.*, 2011). Adicionalmente, um côndilo mandibular humano corretamente estruturado foi sintetizado com sucesso (Alhadlaq *et al.*, 2004). Estas descobertas podem indicar uma prova inicial de que as terapias com células estaminais permitirão regenerar côndilos articulares, como por exemplo no contexto da artrite reumatoide (Egusa *et al.*, 2012b).

7.3.3 Regeneração da língua

A perda de tecido lingual devido a ressecção cirúrgica pode afetar profundamente a qualidade de vida de um paciente, pois a língua representa um papel crítico na fala, deglutição e proteção das vias respiratórias. Esta é uma estrutura complexa que inclui fibras músculo-esqueléticas, mucosa com papilas gustativas e tecido nervoso; assim, a sua regeneração funcional é difícil. Por isso, a reconstrução de defeitos linguais tem sido um desafio permanente em medicina dentária.

A reconstrução de tecido lingual a partir de técnicas celulares foi reportada num modelo animal, resultando em regeneração muscular bem sucedida, com contratura muscular reduzida (Bunaprasert *et al.*, 2003; Luxameechanporn *et al.*, 2006). Outro

estudo (Egusa *et al.*, 2013) demonstrou a importância do alinhamento celular para criar músculo esquelético fisiológico.

Os avanços nas técnicas de engenharia de tecidos e uso de células estaminais podem permitir, um dia, a reconstrução de tecido lingual com função fisiológica normal (Egusa *et al.*, 2012b).

7.4 Implantologia

A regeneração integral de um dente tem sido desejada como tratamento definitivo. Embora a eficácia clínica e previsibilidade dos implantes de titânio seja reconhecida (Sonoyama *et al.*, 2002), estes não funcionam de forma idêntica aos dentes naturais, pois eles integram-se diretamente no osso, sem um interveniente como o ligamento periodontal, através de um processo denominado osteointegração (Brånemark, 1983). Em dentes naturais, o ligamento periodontal desempenha uma função sensorial e torna possível a absorção e distribuição das cargas mastigatórias. Também desempenha um papel importante no movimento dentário e na manutenção da homeostasia entre o ligamento periodontal e osso alveolar.

Clinicamente, uma desvantagem dos implantes é que o material utilizado não se consegue adaptar a alterações nos tecidos circundantes durante o crescimento ou envelhecimento do paciente (Oesterle *et al.*, 1993; Op Heij *et al.*, 2000). Vários estudos recentes descreveram a possibilidade de ocorrência de sensibilidade ao metal após exposição a titânio em alguns pacientes e em determinadas condições (Egusa *et al.*, 2008; Siddiqi *et al.*, 2011). Recessão da mucosa marginal vestibular no local implantar (Chen *et al.*, 2009; Cosyn *et al.*, 2011), fratura do implante ou da sua superestrutura e perda óssea em pacientes com bruxismo (Johansson *et al.*, 2011) são também consequências negativas por vezes encontradas clinicamente.

A Academia de Osteointegração (*Academy of Osteointegration*) declarou, em 2010, que a contínua melhoria na taxa de sucesso dos implantes dentários vai necessitar de tecnologias baseadas em células estaminais, pois as células estaminais osteogénicas num leito implantar poderão providenciar os fatores necessários para a formação de osso que pode contribuir para a estabilidade a longo termo do implante (Aghaloo *et al.*, 2011; Moy *et al.*, 2011). Essa abordagem poderia diminuir a necessidade de uma

membrana de regeneração tecidular guiada, podendo ser usado um único produto sem a necessidade de outros coadjuvantes (Egusa *et al.*, 2012b). A terapia com células estaminais também é potencialmente importante para pacientes com suprimento vascular comprometido e dificuldades de cicatrização, pois seria possível melhorar a vascularização para facilitar o aumento de tecido duro em localizações específicas (Aghaloo *et al.*, 2011). Assim, o uso de células estaminais representa uma estratégia promissora na regeneração de grandes defeitos ósseos alveolares, particularmente no fornecimento de estabilidade e formação acelerada de osso, assim como osteointegração aprimorada em tratamentos com implantes dentários.

7.5 Prostodontia

As novas tecnologias de células estaminais para a regeneração de uma raiz em conjunto com o seu tecido periodontal de suporte pode oferecer inúmeras oportunidades clínicas no tratamento de dentes perdidos ou destruídos (Egusa *et al.*, 2012b; Ikeda *et al.*, 2008). Estudos recentes observaram, *in vivo*, a construção de um dente maduro funcional, acompanhado de ligamento periodontal e osso alveolar, originando um novo conceito na regeneração dentária. O transplante de um dente biosintetizado tem um grande potencial, não apenas para a terapia regenerativa do próprio dente inteiro mas também como tratamento em casos clínicos onde a perda dentária é acompanhada por defeitos ósseos severos (Oshima *et al.*, 2011).

A regeneração de uma raiz dentária é um conceito realista e fazível clinicamente, essencial nomeadamente para prostodontistas, pois a regeneração de uma raiz de um dente pode ser usada como pilar, permitindo técnicas de prótese fixa, como coroas e pontes (Egusa *et al.*, 2012b).

Conclusão

As células estaminais ou *stem cells* são, atualmente, uma opção promissora para a regeneração de tecidos da cavidade oral. Apesar de existirem várias fontes de células estaminais adultas disponíveis, as mais facilmente acessíveis no âmbito da Medicina Dentária estão presentes no dente e tecidos de suporte. As células epiteliais, de onde derivam os ameloblastos, vão formar o esmalte e as células mesenquimatosas, que dão origem aos odontoblastos, são responsáveis pela formação de dentina e de todos os outros tecidos envolvidos no desenvolvimento e manutenção dentária. Assim, teoricamente, após a obtenção de células estaminais epiteliais e mesenquimatosas, seria possível a criação de um dente funcional. Um dos problemas surge logo ao nível da sua colheita, que teria de ser realizada previamente à erupção dentária. Atualmente, as únicas fontes fiáveis destas células são o gérmen dentário de dentes jovens humanos ou de fonte animal, o que implica cirurgia em pacientes jovens para recolha do gérmen dentário no primeiro caso e questões de rejeição imunológica no segundo. Infelizmente, não existe qualquer outra fonte de células epiteliais capaz de regenerar o esmalte após a erupção dentária.

Para além das dificuldades de obtenção de células estaminais, existem outros problemas que devem ser ultrapassados antes de esta tecnologia ser possível. O controlo da erupção e desenvolvimento do dente, o estabelecimento da morfologia e cor, a manutenção da capacidade pluripotencial das células estaminais e a localização de implantação maxilar ideal, são obstáculos que devem ser superados. Também as limitações associadas a dificuldades técnicas de produção, tempo dispendido, custo elevado, reposição de vários dentes e repercussões sociais devem ser consideradas.

Há ainda muitas perguntas que permanecem por responder, pelo que a necessidade de estudos futuros bem estruturados e de longa duração se tornam essenciais. No entanto, a aplicação destas tecnologias às diferentes áreas da Medicina Dentária deve começar a ser considerada como o próximo grande passo na evolução das técnicas de reposição de dentes perdidos e regeneração tecidual.

Referências Bibliográficas

Aghaloo TL, Kang B, Sung EC, Shoff M, Ronconi M, Gotcher JE, Bezouglaia O, Dry SM, Tetradis S. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res*. 2011 Aug;26(8):1871-82.

Al-Quran FA, Al-Ghalayini RF, Al-Zu'bi BN. Single-tooth replacement: factors affecting different prosthetic treatment modalities. *BMC Oral Health*. 2011 Dec 21;11:34. Alhadlaq A, Mao JJ. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *J Dent Res*. 2003 Dec;82(12):951-6.

Alhadlaq A, Elisseeff JH, Hong L, Williams CG, Caplan AI, Sharma B, Kopher RA, Tomkoria S, Lennon DP, Lopez A, Mao JJ. Adult stem cell driven genesis of human-shaped articular condyle. *Ann Biomed Eng*. 2004 Jul;32(7):911-23.

Amar S, Luo W, Snead ML, Ruch JV. Amelogenin gene expression in mouse incisor heterotopic recombinations. *Differentiation*. 1989 Jul;41(1):56-61.

Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Saito M, Otsu K, Harada H, Yamada Y, Fukumoto S. Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. *J Biol Chem*. 2012 Mar 23;287(13):10590-601.

Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, Romanos GE. Platelet-rich plasma in sinus augmentation procedures: a systematic literature review: Part II. *Implant Dent*. 2010 Apr;19(2):145-57.

Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol?. *J Endod*. 2004 Apr;30(4):196-200.

Barber MW, Preston AJ. An update on resin-bonded bridges. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 2008 Mar;16(1):2-9.

Barron JA, Krizman DB, Ringeisen BR. Laser printing of single cells: statistical analysis, cell viability, and stress. *Ann Biomed Eng*. 2005 Feb;33(2):121-30.

Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater*. 2008 Jul 31;16:1-9.

Brånemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent*. 1983 Sep;50(3):399-410.

Brazelton TR, Blau HM. Optimizing techniques for tracking transplanted stem cells in vivo. *Stem Cells*. 2005 Oct;23(9):1251-65.

Bunaprasert T, Hadlock T, Marler J, Kobler J, Cowan D, Faquin W, Varvares M. Tissue engineered muscle implantation for tongue reconstruction: a preliminary report. *Laryngoscope*. 2003 Oct;113(10):1792-7.

Chan RW, Tseng TN. Single tooth replacement--expanded treatment options. *Aust Dent J*. 1994 Jun;39(3):137-49.

Chandki R, Kala M, Banthia P, Banthia R. From stem to roots: Tissue engineering in endodontics. *J Clin Exp Dent*. 2012 Feb;4(1):e66-e71.

Chen ST, Buser D. Clinical and esthetic outcomes of implants placed in postextraction sites. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24 Suppl:186-217.

Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Harris DT. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue. *Cytherapy*. 2013 Mar;15(3):330-43.

Cobourne MT, Hardcastle Z, Sharpe PT. Sonic hedgehog regulates epithelial proliferation and cell survival in the developing tooth germ. *J Dent Res*. 2001 Nov;80(11):1974-9.

Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):962-9.

Cosyn J, Eghbali A, De Bruyn H, Collys K, Cleymaet R, De Rouck T. Immediate single-tooth implants in the anterior maxilla: 3-year results of a case series on hard and soft tissue response and aesthetics. *J Clin Periodontol*. 2011 Aug;38(8):746-53.

Coura GS, Garcez RC, de Aguiar CB, Alvarez-Silva M, Magini RS, Trentin AG. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *J Periodontal Res.* 2008 Oct;43(5):531-6.

d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ.* 2007 Jun;14(6):1162-71.

De Gemmis P, Lapucci C, Bertelli M, Tognetto A, Fanin E, Vettor R, Pagano C, Pandolfo M, Fabbri A. A real-time PCR approach to evaluate adipogenic potential of amniotic fluid-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2006 Oct;15(5):719-28.

a) Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res.* 2012 Jul;56(3):151-65.

b) Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--Part II: Clinical applications. *J Prosthodont Res.* 2012 Oct;56(4):229-48.

Egusa H, Kobayashi M, Matsumoto T, Sasaki J, Uraguchi S, Yatani H. Application of cyclic strain for accelerated skeletal myogenic differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells with cell alignment. *Tissue Eng Part A.* 2013 Mar;19(5-6):770-82.

El-Backly RM, Massoud AG, El-Badry AM, Sherif RA, Marei MK. Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly(lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits. *Aust Endod J.* 2008 Aug;34(2):52-67.

Gafni Y, Turgeman G, Liebergal M, Pelled G, Gazit Z, Gazit D. Stem cells as vehicles for orthopedic gene therapy. *Gene Ther.* 2004 Feb;11(4):417-26.

Gang EJ, Hong SH, Jeong JA, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H. In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived

mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Aug 13;321(1):102-8.

Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res*. 2007 Aug;10(3):149-60.

Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennström J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration Case reports. *J Clin Periodontol*. 1986 Jul;13(6):604-16.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13625-30.

Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002 Aug;81(8):531-5.

Handa K, Saito M, Tsunoda A, Yamauchi M, Hattori S, Sato S, Toyoda M, Teranaka T, Narayanan AS. Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo. *Connect Tissue Res*. 2002;43(2-3):406-8.

Hernandez-Alfaro F, Campos Leitão H, Porta Ferrer C, Ruiz Magaz V. *Controversial Issues in Implant Dentistry*. London; Chicago: Quintessence Publishing, 2013

Hebel K, Gajjar R, Hofstede T. Single-tooth replacement: bridge vs implant-supported restoration. *J Can Dent Assoc*. 2000 Sep;66(8):435-8.

Holm-Pedersen P, Schultz-Larsen K, Christiansen N, Avlund K. Tooth loss and subsequent disability and mortality in old age. *J Am Geriatr Soc*. 2008 Mar;56(3):429-35.

a) Honda MJ, Shinohara Y, Hata KI, Ueda M. Subcultured odontogenic epithelial cells in combination with dental mesenchymal cells produce enamel-dentin-like complex structures. *Cell Transplant*. 2007;16(8):833-47.

Honda MJ, Sumita Y, Kagami H, Ueda M. Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. *Arch Histol Cytol.* 2005 Jun;68(2):89-101.

Honda MJ, Shimodaira T, Ogaeri T, Shinohara Y, Hata K, Ueda M. A novel culture system for porcine odontogenic epithelial cells using a feeder layer. *Arch Oral Biol.* 2006 Apr;51(4):282-90.

b) Honda MJ, Tsuchiya S, Sumita Y, Sagara H, Ueda M. The sequential seeding of epithelial and mesenchymal cells for tissue-engineered tooth regeneration. *Biomaterials.* 2007 Feb;28(4):680-9.

Horst OV, Chavez MG, Jheon AH, Desai T, Klein OD. Stem cell and biomaterials research in dental tissue engineering and regeneration. *Dent Clin North Am.* 2012 Jul;56(3):495-520.

Hu B, Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Perrin-Schmitt F, Peters H, Lesot H. Tissue engineering of tooth crown, root, and periodontium. *Tissue Eng.* 2006 Aug;12(8):2069-75.

Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, Shi S. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A.* 2010 Feb;16(2):605-15.

Hubáľková H, Linetskiy I. New trends in prosthetic dentistry. *Prague Med Rep.* 2006;107(2):149-64.

Hussey DL, Pagni C, Linden GJ. Performance of 400 adhesive bridges fitted in a restorative dentistry department. *J Dent.* 1991 Aug;19(4):221-5.

Ikeda E, Hirose M, Kotobuki N, Shimaoka H, Tadokoro M, Maeda M, Hayashi Y, Kirita T, Ohgushi H. Osteogenic differentiation of human dental papilla mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Apr 21;342(4):1257-62.

Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, Ogawa M, Mizuno M, Kasugai S, Tsuji T. Fully functional bioengineered tooth replacement

as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 11;106(32):13475-80.

Intini G. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials*. 2009 Oct;30(28):4956-66. Ivanovski S. Periodontal regeneration. *Aust Dent J*. 2009 Sep;54 Suppl 1:S118-28.

Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol*. 2001 Aug;17(4):185-7.

Jernvall J, Thesleff I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev*. 2000 Mar 15;92(1):19-29.

Johansson A, Omar R, Carlsson GE. Bruxism and prosthetic treatment: a critical review. *J Prosthodont Res*. 2011 Jul;55(3):127-36.

Joraku A, Sullivan CA, Yoo JJ, Atala A. Tissue engineering of functional salivary gland tissue. *Laryngoscope*. 2005 Feb;115(2):244-8. Karring T. Regenerative periodontal therapy. *J Int Acad Periodontol*. 2000 Oct;2(4):101-9.

Kémoun P, Laurencin-Dalicious S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F, Briand-Mesange F, Gadelorge M, Arzate H, Narayanan AS, Brunel G, Salles JP. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res*. 2007 Aug;329(2):283-94.

Kikuchi H, Suzuki K, Sakai N, Yamada S. Odontoblasts induced from mesenchymal cells of murine dental papillae in three-dimensional cell culture. *Cell Tissue Res*. 2004 Aug;317(2):173-85.

Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LI, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, Daley GQ. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2010 Sep 16;467(7313):285-90.

Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, Hara Y, Sakagami R, Hirofuji T, Hamachi T, Maeda K, Yokota M, Kido J, Nagata T, Kurihara H, Takashiba S,

Sibutani T, Fukuda M, Noguchi T, Yamazaki K, Yoshie H, Ioroi K, Arai T, Nakagawa T, Ito K, Oda S, Izumi Y, Ogata Y, Yamada S, Shimauchi H, Kunimatsu K, Kawanami M, Fujii T, Furuichi Y, Furuuchi T, Sasano T, Imai E, Omae M, Yamada S, Watanuki M, Murakami S. FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical trial. *J Dent Res*. 2011 Jan;90(1):35-40.

Kojima T, Kanemaru S, Hirano S, Tateya I, Ohno S, Nakamura T, Ito J. Regeneration of radiation damaged salivary glands with adipose-derived stromal cells. *Laryngoscope*. 2011 Sep;121(9):1864-9.

Koussoulakou DS, Margaritis LH, Koussoulakos SL. A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *Int J Biol Sci*. 2009;5(3):226-43.

Kumabe S, Nakatsuka M, Kim GS, Jue SS, Aikawa F, Shin JW, Iwai Y. Human dental pulp cell culture and cell transplantation with an alginate scaffold. *Okajimas Folia Anat Jpn*. 2006 Feb;82(4):147-55.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920-6.

Laughlin MJ. Umbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults. *Bone Marrow Transplant*. 2001 Jan;27(1):1-6.

Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*. 2007 Jul;23(7):844-54.

Lin C, Dong QS, Wang L, Zhang JR, Wu LA, Liu BL. Dental implants with the periodontium: a new approach for the restoration of missing teeth. *Med Hypotheses*. 2009 Jan;72(1):58-61.

Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM, Gronthos S, Shi S, Wang S. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells*. 2008 Apr;26(4):1065-73.

Lombaert IM, Brunsting JF, Wierenga PK, Faber H, Stokman MA, Kok T, Visser WH, Kampinga HH, de Haan G, Coppes RP. Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands. *PLoS One*. 2008 Apr 30;3(4):e2063.

Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Dec 22;13(1):27-38.

Luo Y, Shoichet MS. A photolabile hydrogel for guided three-dimensional cell growth and migration. *Nat Mater.* 2004 Apr;3(4):249-53.

Luxameechanporn T, Hadlock T, Shyu J, Cowan D, Faquin W, Varvares M. Successful myoblast transplantation in rat tongue reconstruction. *Head Neck.* 2006 Jun;28(6):517-24.

Lymperi S, Ligoudistianou C, Taraslia V, Kontakiotis E, Anastasiadou E. Dental Stem Cells and their Applications in Dental Tissue Engineering. *Open Dent J.* 2013;7:76-81.

Mammen B, Ramakrishnan T, Sudhakar U, Vijayalakshmi. Principles of gene therapy. *Indian J Dent Res.* 2007 Oct-Dec;18(4):196-200.

Mao JJ. Stem cells and the future of dental care. *N Y State Dent J.* 2008 Mar;74(2):20-4.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):5807-12.

Miyajima H, Matsumoto T, Sakai T, Yamaguchi S, An SH, Abe M, Wakisaka S, Lee KY, Egusa H, Imazato S. Hydrogel-based biomimetic environment for in vitro modulation of branching morphogenesis. *Biomaterials.* 2011 Oct;32(28):6754-63.

Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005 Apr;24(2):155-65.

Moy PK, Iacono VJ. The Academy of Osseointegration Silver Anniversary Summit: impact of biological and technological advances on implant dentistry Introduction. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011;26 Suppl:7-10.

Murakami S. Periodontal tissue regeneration by signaling molecule(s): what role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy?. *Periodontol 2000*. 2011 Jun;56(1):188-208.

Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*. 2007 Apr;33(4):377-90.

Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saitoh M, Tomooka Y, Tsuji T. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods*. 2007 Mar;4(3):227-30. Epub 2007 Feb 18.

Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005 Jun;16(3):369-76.

Nanduri LS, Maimets M, Pringle SA, van der Zwaag M, van Os RP, Coppes RP. Regeneration of irradiated salivary glands with stem cell marker expressing cells. *Radiother Oncol*. 2011 Jun;99(3):367-72.

Nedel F, André Dde A, de Oliveira IO, Cordeiro MM, Casagrande L, Tarquinio SB, Nor JE, Demarco FF. Stem cells: therapeutic potential in dentistry. *J Contemp Dent Pract*. 2009 Jul 1;10(4):90-6.

Needleman IG, Worthington HV, Giedrys-Leeper E, Tucker RJ. Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Apr 19.

Nyman S, Gottlow J, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. New attachment formation by guided tissue regeneration. *J Periodontal Res*. 1987 May;22(3):252-4.

Oesterle LJ, Cronin RJ Jr, Ranly DM. Maxillary implants and the growing patient. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993;8(4):377-87.

Op Heij DG, Opdebeeck H, van Steenberghe D, Quirynen M. Age as compromising factor for implant insertion. *Periodontol 2000*. 2003;33:172-84.

Orciani M, Trubiani O, Vignini A, Mattioli-Belmonte M, Di Primio R, Salvolini E. Nitric oxide production during the osteogenic differentiation of human periodontal ligament mesenchymal stem cells. *Acta Histochem*. 2009;111(1):15-24.

Oshima M, Mizuno M, Imamura A, Ogawa M, Yasukawa M, Yamazaki H, Morita R, Ikeda E, Nakao K, Takano-Yamamoto T, Kasugai S, Saito M, Tsuji T. Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS One*. 2011;6(7):e21531.

Otaki S, Ueshima S, Shiraishi K, Sugiyama K, Hamada S, Yorimoto M, Matsuo O. Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. *Cell Biol Int*. 2007 Oct;31(10):1191-7.

Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, Apostolou E, Stadtfeld M, Li Y, Shioda T, Natesan S, Wagers AJ, Melnick A, Evans T, Hochedlinger K. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2010 Aug;28(8):848-55.

Pompilio G, Cannata A, Peccatori F, Bertolini F, Nascimbene A, Capogrossi MC, Biglioli P. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for myocardial regeneration: a novel strategy for cell collection and surgical injection. *Ann Thorac Surg*. 2004 Nov;78(5):1808-12.

Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, John AS, George A. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod*. 2008 Apr;34(4):421-6.

Rai S, Kaur M, Kaur S. Applications of stem cells in interdisciplinary dentistry and beyond: an overview. *Ann Med Health Sci Res*. 2013 Apr;3(2):245-54.

Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discolouration: a case report. *Int Endod J*. 2009 Jan;42(1):84-92.

Rutherford RB. BMP-7 gene transfer to inflamed ferret dental pulps. *Eur J Oral Sci*. 2001 Dec;109(6):422-4.

Sahrman P, Attin T, Schmidlin PR. Regenerative treatment of peri-implantitis using bone substitutes and membrane: a systematic review. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2011 Mar;13(1):46-57.

Sculean A, Schwarz F, Becker J, Brex M. The application of an enamel matrix protein derivative (Emdogain) in regenerative periodontal therapy: a review. *Med Princ Pract*. 2007;16(3):167-80.

Seo BM, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res*. 2005 Oct;84(10):907-12.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55.

Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J*. 2009 Dec;42(12):1118-26.

Siddiqi A, Payne AG, De Silva RK, Duncan WJ. Titanium allergy: could it affect dental implant integration?. *Clin Oral Implants Res*. 2011 Jul;22(7):673-80.

Soares A, Knop L, Amorim H, Jesus A, Araújo T. Células-tronco em odontologia. *Rev. Dent. Press Ortodon. Ortop. Facial*. 2007; 12(1): 33-40.

Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Wang S, Shi S. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*. 2006 Dec 20;1:e79.

Sonoyama W, Kuboki T, Okamoto S, Suzuki H, Arakawa H, Kanyama M, Yatani H, Yamashita A. Quality of life assessment in patients with implant-supported and resin-bonded fixed prosthesis for bounded edentulous spaces. *Clin Oral Implants Res*. 2002 Aug;13(4):359-64.

Sumita Y, Liu Y, Khalili S, Maria OM, Xia D, Key S, Cotrim AP, Mezey E, Tran SD. Bone marrow-derived cells rescue salivary gland function in mice with head and neck irradiation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011 Jan;43(1):80-7.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72.

Tanabe K, Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotency by defined factors. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2014;90(3):83-96.

Teti A. Bone development: overview of bone cells and signaling. *Curr Osteoporos Rep*. 2011 Dec;9(4):264-73.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.

Tran SD, Wang J, Bandyopadhyay BC, Redman RS, Dutra A, Pak E, Swaim WD, Gerstenhaber JA, Bryant JM, Zheng C, Goldsmith CM, Kok MR, Wellner RB, Baum BJ. Primary culture of polarized human salivary epithelial cells for use in developing an artificial salivary gland. *Tissue Eng*. 2005 Jan-Feb;11(1-2):172-81.

Trojani C, Weiss P, Michiels JF, Vinatier C, Guicheux J, Daculsi G, Gaudray P, Carle GF, Rochet N. Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel. *Biomaterials*. 2005 Sep;26(27):5509-17.

Ulmer FL, Winkel A, Kohorst P, Stiesch M. Stem cells--prospects in dentistry. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2010;120(10):860-83.

Williams VD, Thayer KE, Denehy GE, Boyer DB. Cast metal, resin-bonded prostheses: a 10-year retrospective study. *J Prosthet Dent*. 1989 Apr;61(4):436-41.

Witter DJ, Hoefnagel RA, Gerritsen AE, Creugers NH. [Single and multi-teeth fixed prostheses--functions and types]. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 2012 Dec;119(12):595-605.

Yamanaka S, Takahashi K. [Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures]. Tanpakushitsu Kakusan Koso. 2006 Dec;51(15):2346-51.

Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2007 Jun 7;1(1):39-49.

Yang ZH, Zhang XJ, Dang NN, Ma ZF, Xu L, Wu JJ, Sun YJ, Duan YZ, Lin Z, Jin Y. Apical tooth germ cell-conditioned medium enhances the differentiation of periodontal ligament stem cells into cementum/periodontal ligament-like tissues. J Periodontal Res. 2009 Apr;44(2):199-210.

Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. J Dent Res. 2008 Aug;87(8):767-71.

Yokoi T, Saito M, Kiyono T, Iseki S, Kosaka K, Nishida E, Tsubakimoto T, Harada H, Eto K, Noguchi T, Teranaka T. Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. Cell Tissue Res. 2007 Feb;327(2):301-11. PubMed PMID: 17013589.

Yoshida K, Yoshida N, Aberdam D, Meneguzzi G, Perrin-Schmitt F, Stoetzel C, Ruch JV, Lesot H. Expression and localization of laminin-5 subunits during mouse tooth development. Dev Dyn. 1998 Feb;211(2):164-76.

Yu H, Yang X, Cheng J, Wang X, Shen SG. Distraction osteogenesis combined with tissue-engineered cartilage in the reconstruction of condylar osteochondral defect. J Oral Maxillofac Surg. 2011 Dec;69(12):e558-64.

Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. Cell Res. 2005 May;15(5):301-16.

Anexos

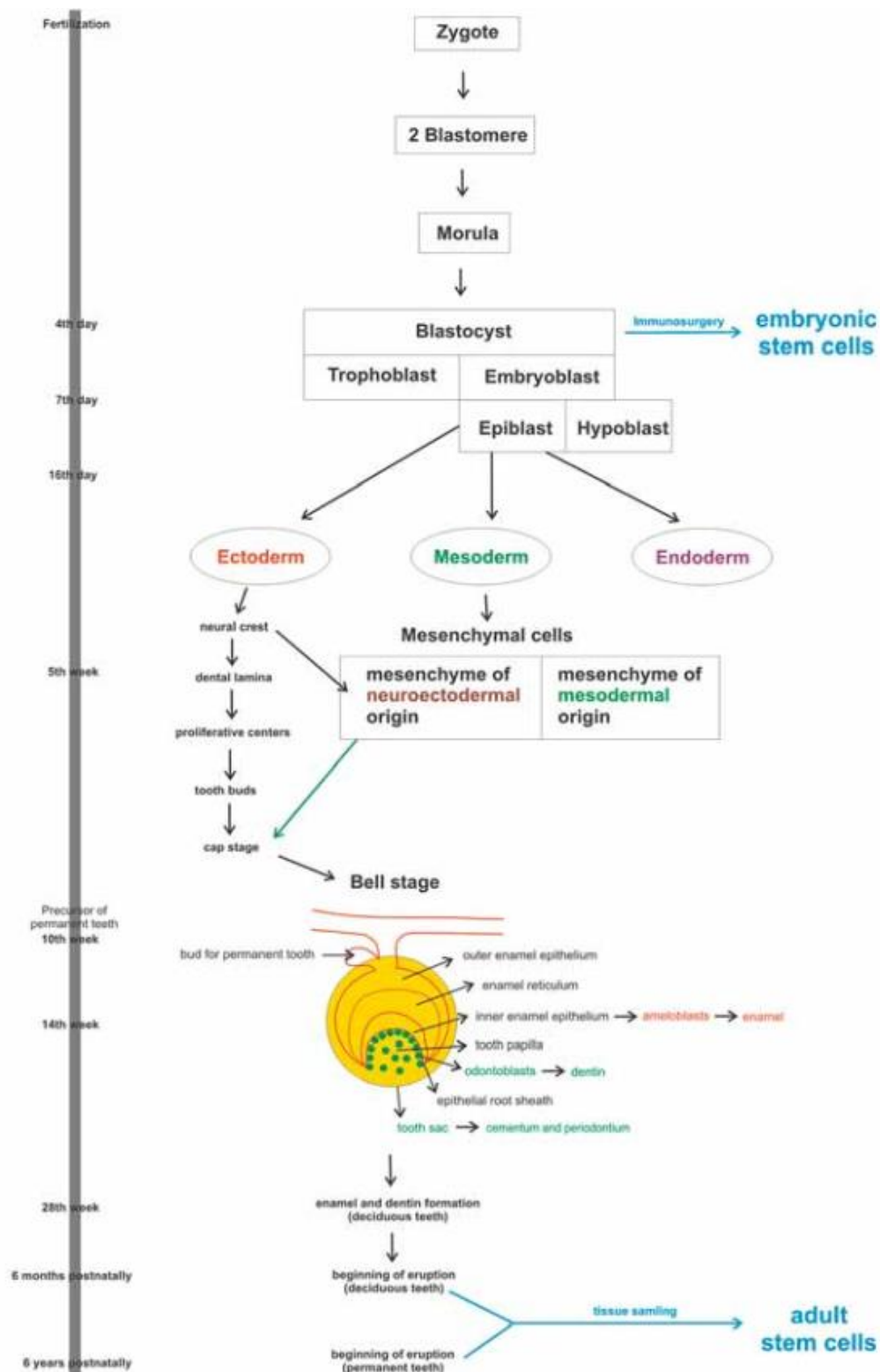


Ilustração 3 – Embriogénese e odontogénese (adaptado de Ulmer *et al.*, 2010)

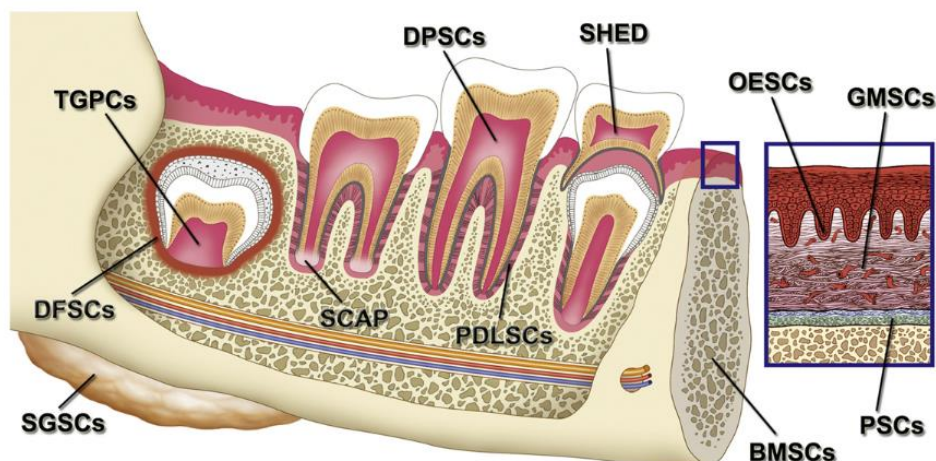


Ilustração 2 - Fontes de *stem cells* na região oral e maxilofacial (adaptado de Egusa *et al.*, 2012^a)

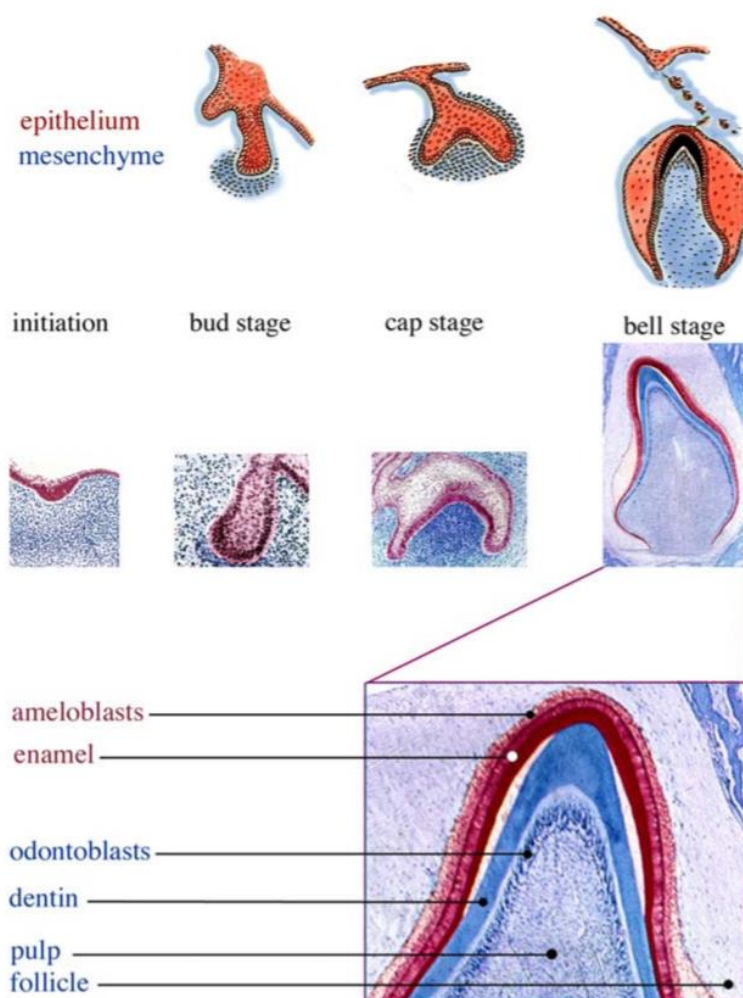


Ilustração 3 - Ilustração esquemática e seções histológicas demonstrando os diferentes estádios da odontogênese em humanos (adaptado de Bluteau *et al.*, 2008)

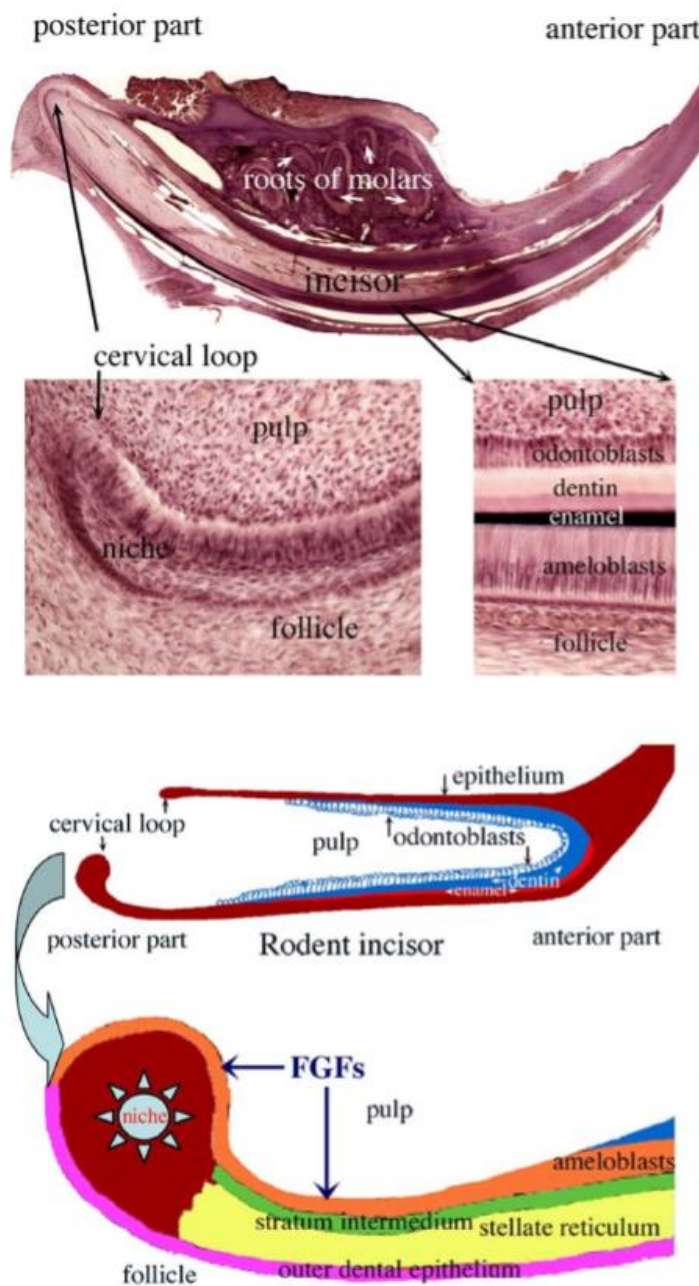


Ilustração 4- Cortes histológicos e representação esquemática de um incisivo mandibular de um roedor (adaptado de Bluteau *et al.*, 2008)

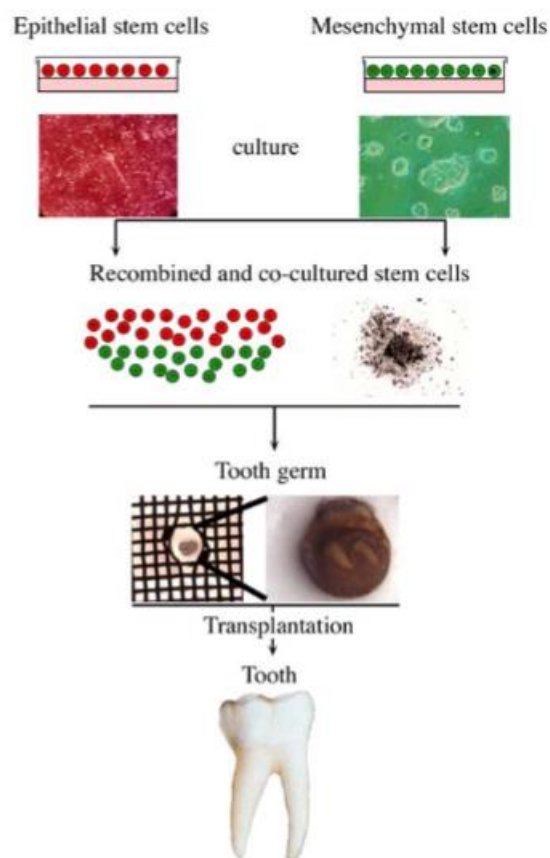


Ilustração 5 - Uso de *stem cells* para formação de um dente *in vivo* e *ex vivo* (adaptado de Bluteau *et al.*, 2008)